

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
30 mai 2002 (30.05.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/41691 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ : **A01K**

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/03701

(22) Date de dépôt international :
23 novembre 2001 (23.11.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
00/15240 24 novembre 2000 (24.11.2000) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : **COM-
MISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE** [FR/FR];
31-33 rue de la Fédération, F-75015 Paris (FR). **IN-
STITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE-INSERM** [FR/FR]; 101
rue de Tolbiac, F-75654 Cedex 13 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **AN-
DRIEUX, Annie** [FR/FR]; 22 rue Mallifaud, F-38100

Grenoble (FR). **JOB, Didier** [FR/FR]; 22 rue du Trident,
F-38100 Grenoble (FR). **DENARIER, Eric** [FR/FR]; Ap-
partement 8224, 170 val de l'Arlequin, F-38100 Grenoble
(FR). **BOSC, Christophe** [FR/FR]; 1 avenue Albert Ier
de Belgique, F-38000 Grenoble (FR). **VERNET, Muriel**
[FR/FR]; 118 cours Jean Jaurès, F-38000 Grenoble (FR).

(74) Mandataire : **CABINET ORES**; 6 avenue de Messine,
F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés (national) : CA, IL, JP, US.

(84) États désignés (régional) : brevet européen (AT, BE, CH,
CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
SE, TR).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.*

(54) Title: TRANSGENIC OR RECOMBINANT NON-HUMAN MAMMALS AND THEIR USES IN SCREENING PSYCHO-
ACTIVE MEDICINES

(54) Titre : MAMMIFERES NON-HUMAINS TRANSGENIQUES OU RECOMBINANTS ET LEURS APPLICATIONS DANS
LE CRIBLAGE DE MEDICAMENTS PSYCHOACTIFS

(57) Abstract: The invention concerns transgenic or recombinant non-human mammals, wherein the expression of the gene coding
for a microtubule associated protein (MAP) is modified (STOP gene) (inactivation or overexpression) and their uses in screening
medicines useful in schizophrenia and schizo-affective disorders, with anxious, paranoiac or depressive component.

(57) Abrégé : Mammifères non-humains transgéniques ou recombinants, dans lesquels l'expression du gène codant pour une pro-
téine associée aux microtubules (MAP) est modifiée (gène STOP) (inactivation ou surexpression) et leurs applications dans le criblage
de médicaments utiles dans la schizophrénie et les désordres schizoaffectifs, à composante anxieuse, paranoïaque ou dépressive.



WO 02/41691 A2

**MAMMIFERES NON-HUMAINS TRANSGENIQUES OU RECOMBINANTS
ET LEURS APPLICATIONS DANS LE CRIBLAGE DE MEDICAMENTS
PSYCHOACTIFS.**

La présente invention est relative à des mammifères non-humains
5 transgéniques ou recombinants, dans lesquels l'expression du gène codant pour une
protéine associée aux microtubules (MAP) est modifiée (inactivation ou surexpres-
sion) et à leurs applications dans le criblage de médicaments utiles dans l'anxiété, la
schizophrénie et les désordres schizoaffectifs, à composante anxieuse, paranoïaque ou
dépressive.

10 Les microtubules des cellules de mammifères sont soumis à une
régulation : lors de l'interphase, ils organisent l'espace intracellulaire et sont respon-
sables du transport intracellulaire d'organelles ; lors de la mitose, ils se réorganisent
pour former le fuseau mitotique, responsable de la répartition des chromosomes entre
les deux cellules filles.

15 Les microtubules, assemblés *in vitro* à partir de solutions de tubuline
purifiée, sont labiles et rapidement dépolymérisés par l'exposition au froid.

Des comportements semblables sont observés *in vivo*, mais sont,
dans ce cas, régulés par le métabolisme cellulaire. Par exemple, la dépolymérisation
des microtubules est favorisée par la phosphoprotéine stathmine, qui lie et séquestre
20 les dimères de tubuline, alors que la stabilisation des microtubules est médiée par les
protéines associées aux microtubules (MAPs), qui s'associent aux polymères.

Les neurones contiennent des quantités massives de microtubules et
ceux-ci sont en quasi-totalité stables au froid. A partir de préparations de microtubules
stables neuronaux, une protéine calmoduline-régulée capable de stabiliser totalement
25 les microtubules (c'est-à-dire apte à supprimer leur activité dynamique et à les rendre
résistants au froid) a été isolée ; il s'agit de la protéine STOP (pour *Stable Tubulin
Only Polypeptide*). La nature moléculaire de cette protéine est longtemps restée
énigmatique. Un pas décisif a été franchi en 1996 lorsque l'ADNc codant pour cette
protéine STOP a été cloné (Christophe Bosc et al., P.N.A.S., 1996, **93**, 2125-2130).

30 La protéine STOP, qui peut bloquer de manière réversible la dyna-
mique des microtubules en abolissant complètement la sensibilité des microtubules
neuronaux au froid et aux drogues dépolymérisantes, comporte deux domaines répétés

remarquables : un domaine central composé de cinq répétitions quasi-parfaites d'un motif de 46 acides aminés et un domaine carboxy-terminal formé de vingt huit répétitions imparfaites d'un motif de 11 acides aminés. Ces deux domaines répétés sont séparés par une séquence contenant en abondance des résidus lysine et arginine (domaine KR) et par une séquence de liaison ou séquence *linker*. Le domaine N-terminal de la protéine STOP contient des séquences riches en proline qui constituent des sites de liaison potentiels avec des domaines SH3 (*src homology domain 3*).

La structure en exons du gène STOP de souris a été élucidée (Eric Denarier et al., B.B.R.C., 1998, **243**, 791-796). Cette structure correspond à la structure en domaines de la protéine : l'exon 1 code pour le domaine N-terminal y compris le domaine répété central, l'exon 2 code pour la séquence *linker*, l'exon 3 code pour le domaine KR et l'exon 4 code pour la région répétée carboxy-terminale.

La distribution et le rôle de la protéine STOP dans les neurones ont été récemment caractérisés (Laurent Guillaud et al., *Cell Biol.*, 1998, **142**, 1, 167-179). La distribution de la protéine a été étudiée au niveau ultrastructural dans des cellules neuronales embryonnaires, les cellules DRG (*Dorsal Root Ganglia*), qui peuvent se différencier *in vitro* et a révélé l'existence d'isoformes de cette protéine. Une isoforme majeure (protéine E-STOP) a été caractérisée : cette isoforme apparaît plus tôt dans le développement que la protéine STOP standard ou protéine N-STOP et est majoritaire dans le cerveau embryonnaire. L'ADNc d'E-STOP présente la séquence correspondant au numéro d'accension Genbank AJ002556. La protéine E-STOP diffère de la protéine N-STOP par la délétion des séquences carboxy-terminales répétées, codées par l'exon 4 ; il s'agit donc d'un variant d'épissage de la protéine STOP. Une autre isoforme, la protéine F-STOP a été observée dans des fibroblastes de souris (cellules 3T3). Cette protéine, de masse moléculaire apparente de 45 kDa, est beaucoup plus petite que la protéine N-STOP (115 kDa) ou que la protéine E-STOP (88 kDa). Le clonage et le séquençage de l'ADNc correspondant (Genbank Y16032 et Eric Denarier et al., *P.N.A.S.*, 1998, **95**, 6055-6060) ont montré que les séquences codées par les exons 3 et 4 (KR et répétitions carboxy-terminales) sont absentes dans la protéine F-STOP. De plus, la majeure partie du domaine N-terminal de la protéine N-STOP, située en amont des répétitions centrales et codée par l'exon 1, est absente dans la protéine F-STOP. La protéine F-STOP comprend donc les séquences codées par l'exon 2 et une partie de

celles correspondant à l'exon 1, incluant les répétitions centrales. Malgré de multiples délétions, la protéine F-STOP a les mêmes propriétés fonctionnelles de base que la protéine N-STOP : la protéine F-STOP se lie à la calmoduline et a la capacité d'induire une stabilisation au froid des microtubules, *in vitro* et *in vivo*. Contrairement à la protéine N-STOP qui semble presque en permanence associée aux microtubules, la protéine F-STOP reste dans la phase soluble dans les cellules en interphase et ne s'associe aux microtubules que lors de l'exposition au froid. Apparemment, des mécanismes de régulation empêchent la protéine F-STOP d'interagir avec le cytosquelette microtubulaire en interphase, permettant ainsi une dynamique microtubulaire rapide, et ces régulations sont inhibées dès que les cellules sont exposées à des températures basses. Dans les cellules mitotiques, la protéine F-STOP est associée aux fuseaux de microtubules, à température physiologique.

Ainsi, une seule et même classe de protéines, les protéines STOP, est responsable de la stabilisation des microtubules dans plusieurs types cellulaires différents.

Les formes N, E et F de la protéine STOP ne sont pas les seules isoformes existantes ; en effet, les protéines STOPs sont présentes dans de nombreux tissus, en particulier dans les poumons qui contiennent une isoforme spécifique. De même, la forme F-STOP paraît présente dans des tissus variés. Par contre, les protéines N-STOP et E-STOP sont, semble-t-il, strictement neuronales (C. Bosc et al., *Cell Struct. Function*, 1999, **24**, 393-399).

Il semblerait que la stabilité des microtubules soit importante pour le développement et le maintien de la morphologie et de la fonction des neurones (Laurent Guillaud et al., précité). Ainsi, il a été montré que l'inhibition des protéines STOP *in vitro* par l'injection d'anticorps bloquants spécifiques, supprime la stabilité des microtubules au froid, dans des cellules neuronales ou non-neuronales (Eric Denarier, P.N.A.S., 1998, précité). Il a également été montré que l'inhibition des protéines STOP *in vitro* dans des neurones, altère la différenciation neuronale (Laurent Guillaud et al., précité).

Les Inventeurs ont trouvé, de manière inattendue, que l'invalidation des différentes isoformes de la protéine STOP permet d'obtenir des animaux et

notamment des souris particulièrement utiles pour le criblage des médicaments psychoactifs.

La présente invention a en conséquence pour objet un mammifère non-humain recombinant, porteur d'au moins un allèle modifié du gène codant une
5 protéine STOP.

On entend par gène STOP modifié, aussi bien un gène altéré (animaux *knock-in*), qu'un gène inactivé totalement ou partiellement, inhibé ou tronqué (animaux *knock-out*).

De manière avantageuse, lesdits animaux recombinants ou trans-
10 géniques sont susceptibles d'être obtenus par recombinaison homologue dans une cellule souche embryonnaire :

- soit par insertion d'au moins un codon STOP ou d'une séquence anti-sens,

- soit par délétion d'une partie ou de tout le gène natif (région
15 codante ou régions non codantes, promoteur, séquences régulatrices en 3', activateurs),

- soit par substitution de séquence.

De manière plus précise, une construction conforme à l'invention est avantageusement sélectionnée dans le groupe constitué par :

- 20 - des constructions contenant une séquence codant pour une protéine STOP anti-sens, qui va bloquer l'expression de la séquence STOP native,

- des constructions comprenant la région du promoteur STOP (positions 1-3400 de la figure 2) en combinaison avec un gène rapporteur ou avec la région codante STOP. Des marqueurs de sélection positive ou négative peuvent avantageu-
25 sement être inclus, tel que lacZ, dont la régulation de l'expression entraînera la détection d'un changement du phénotype. Un gène rapporteur préféré est le gène de la GFP (*green fluorescent protein*).

- des constructions comprenant au moins une portion du gène STOP (région codante ou régions non codantes, promoteur, séquences régulatrices en 3',
30 activateurs) incluant la/les modifications souhaitées (délétions, mutations etc..) ; de manière avantageuse, les constructions d'ADN utilisées pour une intégration ciblée

doivent inclure une région présentant une homologie avec la séquence cible (gène STOP), pour induire une recombinaison.

- des constructions comprenant au moins une portion du gène STOP, liée de manière opérationnelle à un promoteur, qui peut être constitutif ou inductible et à d'autres séquences régulatrices nécessaires pour l'expression dans l'animal hôte. Par
5 lien de manière opérationnelle, on entend qu'une séquence d'ADN et une séquence régulatrice sont associées de telle manière qu'elles permettent l'expression du gène lorsque les molécules appropriées, par exemple les protéines activatrices transcriptionnelles, sont liées aux séquences régulatrices.

On entend par gène STOP, au sens de la présente invention, les
10 gènes STOP obtenus à partir de n'importe quel mammifère tel que rat, souris, bœuf ou homme, ou du poulet ou du poisson fugu ainsi que les différentes formes mutées dudit gène STOP ; il inclut également les différents cadres ouverts de lecture, les exons, les introns, les régions non-codantes en 3' et en 5' impliquées dans la régulation de
15 l'expression de ce gène, jusqu'à environ 4 kb de part et d'autre de la région codante, le promoteur et les activateurs.

De manière préférée, les constructions sont sélectionnées parmi les constructions suivantes :

- des constructions qui incluent un fragment de la séquence
20 génomique codant pour une protéine STOP comprise entre le codon d'initiation et le codon STOP (C. Bosc et al., E. Denarier et al., L. Guillaud et al. précités), incluant notamment tous les introns normalement présents dans le chromosome natif. Elle peut inclure les régions non traduites en 3' et en 5' retrouvées dans l'ARNm mature. Elle peut, en outre, inclure des séquences de régulation de la transcription ou de la traduction (promoteur, activateur...), incluant environ 4 kb, des régions génomiques
25 flanquantes en 3' ou en 5'.

- des constructions ne comprenant pas la région comprise entre les positions 4118 et 5131 de la séquence génomique codant pour une protéine STOP.

- des constructions comprenant 4,1 kb du gène STOP (correspondant
30 aux positions 1-4118 de la figure 2), le gène codant pour la β -galactosidase, placé sous le contrôle du promoteur STOP endogène, un gène de résistance à la néomycine sous le contrôle du promoteur PGK, 1,57 kb de séquence du gène STOP (correspondant

aux positions 5131-6701 de la séquence de la figure 2) et enfin le gène de la thymidine kinase, sous le contrôle du promoteur PGK.

Conformément à l'invention, les animaux transgéniques obtenus constituent deux groupes, les animaux *knock-out* et les animaux *knock-in*.

5 Dans le cadre de la présente invention :

- les animaux *knock-out* ont une perte de fonction partielle ou complète dans un ou les deux allèles du gène codant pour une protéine STOP endogène ; un tel gène modifié n'induit plus d'expression de la protéine STOP correspondante. Les animaux *knock-out* selon l'invention incluent également des animaux *knock-out* conditionnels : (i) modification du gène codant pour une protéine STOP qui
10 n'intervient qu'après exposition de l'animal à une substance qui induit la modification dudit gène, (ii) introduction d'une enzyme qui induit la recombinaison au niveau d'un site du gène codant pour une protéine STOP (Cre dans le système Cre-lox, par exemple) ou (iii) autre méthode qui induit une modification du gène codant pour une
15 protéine STOP après la naissance.

- les animaux *knock-in* présentent un transgène qui altère le gène endogène codant pour une protéine STOP. Un animal *knock-in* correspond à une altération dans les cellules de l'hôte qui entraîne une expression modifiée ou une fonction modifiée du gène STOP natif. Une expression augmentée ou diminuée peut être ainsi
20 obtenue par introduction d'une copie supplémentaire du gène STOP ou par insertion opérationnelle d'une séquence de régulation qui produit une expression significativement augmentée d'une copie endogène du gène STOP. Ces changements peuvent être soit constitutifs, soit conditionnels, en fonction de la présence d'un activateur ou d'un répresseur. Le gène exogène est soit obtenu à partir d'une espèce différente de celle de
25 l'animal hôte ou est modifié au niveau de sa séquence codante ou non codante. Le gène introduit peut être un gène du type sauvage ou une séquence manipulée, par exemple présentant des délétions, des substitutions ou des insertions dans les régions codantes ou non codantes.

Les deux méthodes peuvent être combinées : dans un premier temps
30 le gène d'origine est invalidé, puis dans un deuxième temps, une forme modifiée dudit gène est introduite dans ledit animal.

Les animaux recombinants ou transgéniques ainsi obtenus comprennent une séquence d'acide nucléique exogène, présente, soit sous la forme d'un élément extra-chromosomique, soit intégrée de manière stable dans tout ou une partie des cellules dudit animal, plus particulièrement les cellules germinales.

- 5 De manière surprenante, les souris homozygotes contenant les deux allèles du gène STOP inactivés (souris *knock-out* ou STOP KO (-/-)), obtenues par croisement d'animaux hétérozygotes sont viables et ne présentent aucune modification anatomique du cerveau ; en revanche, elles présentent des déficits de la plasticité synaptique, associés à des troubles majeurs multiples du comportement comprenant
- 10 un défaut complet de maternage, une profonde anxiété, une incapacité à reconnaître les objets et des interactions sociales anormales.

De façon très intéressante, ces troubles multiples du comportement peuvent être améliorés par l'administration prolongée de neuroleptiques.

- En conséquence, les souris dans lesquelles le gène STOP a été
- 15 inactivé (souris STOP KO (-/-)) constituent un modèle particulièrement utile pour l'étude et le traitement des maladies impliquant un défaut synaptique qui sont sensibles aux neuroleptiques, notamment la schizophrénie et les désordres schizoaffectifs à composante anxieuse, paranoïaque ou dépressive.

- La présente invention a également pour objet l'utilisation dudit
- 20 mammifère non-humain recombinant porteur d'au moins un allèle du gène codant pour une protéine STOP modifié, pour la sélection ou le criblage de produits psychoactifs.

- La présente invention a également pour objet des molécules d'acide nucléique comprenant la séquence d'un allèle modifié du gène codant pour une
- 25 protéine STOP tel que défini ci-dessus (notamment les séquences de gènes STOP inactivés), à l'exclusion des séquences correspondant aux numéros d'accension GENBANK AJ002556 et Y16032.

- Les séquences STOP selon l'invention sont notamment obtenues par mutation, de différentes manières connues en elles-mêmes, pour générer les modifica-
- 30 tions ciblées recherchées : substitutions, insertions ou délétions au niveau d'un domaine ou d'un exon, qui conduisent à l'expression d'une protéine STOP inactivée

ou à l'absence d'expression de protéine STOP. Les délétions peuvent inclure des modifications importantes : délétion d'un domaine ou d'un exon (exon 1 notamment).

Les fragments desdites séquences sont avantageusement obtenus par synthèse chimique d'oligonucléotides, par digestion enzymatique ou par amplification
5 PCR par exemple.

Lesdits fragments comprennent au moins 15 nucléotides, de préférence environ 18 nucléotides et de manière préférée au moins 50 nucléotides.

De tels fragments sont utiles comme amorces de PCR ou pour le criblage par hybridation, des clones ES recombinants ou des animaux recombinants.

10 Lesdites amorces ou sondes de criblage de clones ES recombinants ou d'animaux recombinants sont caractérisées en ce qu'elles sont sélectionnées dans le groupe constitué par des fragments d'un gène STOP comprenant au moins 15 nucléotides, de préférence environ 18 nucléotides et de manière préférée au moins 50 nucléotides. De telles amorces ou sondes permettent de cribler des cellules ou des
15 animaux comprenant l'une des séquences modifiées, telles que définies ci-dessus.

De manière préférée, les amorces suivantes sont utilisées pour le criblage :

. oligonucléotide A4080 : positions 4067-4095 de la figure 2 (SEQ ID NO:3) ;

20 . oligonucléotide 770 : positions 4488-4515 de la figure 2 (SEQ ID NO:4) ;

. oligonucléotide AS2 : positions 6680-6701 de la figure 2 (SEQ ID NO:5).

Des fragments plus importants (plus de 100 nucléotides) sont utiles
25 pour la production des protéines STOP.

Les séquences homologues aux séquences STOP clonées sont identifiées par différentes méthodes connues de l'Homme du métier.

La similarité des séquences d'acides nucléiques est détectée par hybridation dans des conditions de faible stringence, par exemple à 50°C et 10 x SSC
30 (0,9 M de tampon salin et 0,09 M de citrate de sodium).

Lesdites séquences restent associées lorsqu'elles sont soumises à un lavage à 55°C dans un tampon 1 x SSC.

L'identité des séquences peut être déterminée par hybridation dans des conditions stringentes, par exemple à 50°C au plus et 0,1 x SSC (9 mM de tampon salin/0,9 mM de citrate de sodium).

La présente invention a également pour objet des sondes de détection et de criblage de l'ADN génomique par hybridation des clones ES recombinants ou des animaux recombinants, caractérisées en ce qu'elles sont constituées par un fragment du même gène STOP, situé en dehors (amont ou aval) de la séquence du gène STOP issue du vecteur de recombinaison mis en œuvre (zone de recombinaison homologue).

De manière avantageuse, ladite sonde correspond aux positions 700-1881 de la figure 3 (SEQ ID NO:6).

La présente invention a également pour objet un procédé de criblage et de sélection de molécules utiles dans le traitement de la schizophrénie et des troubles schizoaffectifs à composante anxieuse, paranoïaque ou dépressive, caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

- la mise en contact *in vitro* d'au moins une substance à cribler avec un échantillon biologique constitué par un extrait de cellules ou des tranches d'organes, de préférence neuronales ou cérébrales, obtenu à partir d'au moins un mammifère non-humain recombinant porteur d'au moins un allèle modifié du gène codant pour une protéine STOP,
- la mesure de l'action de ladite substance à cribler sur lesdites cellules ou tranches d'organes et
- la comparaison des valeurs obtenues avec celles des cellules ou des tranches d'organes d'un échantillon biologique obtenu à partir d'un mammifère non-humain du même type, porteur de deux allèles sauvages du gène codant pour une protéine STOP.

Les substances testées sont notamment obtenues à partir de banques de substances (naturelles ou synthétiques).

Selon un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, ladite mesure est effectuée à l'aide d'un test de liaison protéine-protéine ; dans un tel cas, une ou plusieurs des molécules mises en œuvre peuvent être marquées par un

marqueur ; ledit marqueur peut fournir un signal détectable soit directement, soit indirectement.

Parmi les marqueurs utilisables, on peut citer par exemple, les radioisotopes, les molécules fluorescentes, chemiluminescentes, les enzymes, les
5 molécules de liaison spécifique, des particules telles que des particules magnétiques, etc...

Des molécules de liaison spécifique incluent des paires de molécules telles que la biotine et la streptavidine, la digoxine et l'anti-digoxine, etc...

Pour les membres de liaison spécifique, le membre complémentaire
10 sera marqué avec une molécule adaptée à la détection, conformément aux méthodes connues.

Beaucoup d'autres réactifs peuvent être utilisés dans un tel test de criblage ; il inclut par exemple des sels, des protéines neutres telles que l'albumine, des détergents, etc..., qui sont utilisés pour faciliter une liaison protéine-protéine opti-
15 male et/ou réduire les interactions non-spécifiques ou de bruit de fond.

Les réactifs qui améliorent l'efficacité de l'essai, tels que les inhibiteurs de protéases, les inhibiteurs de nucléases, les agents anti-microbiens peuvent également être utilisés.

Le mélange de composants est ajouté dans n'importe quel ordre, de
20 manière à permettre la liaison recherchée.

Les incubations sont réalisées à température convenable, usuellement entre 4°C et 40°C.

Les périodes d'incubation peuvent varier ; elles sont habituellement comprises entre 0,1 et 1 h et sont optimisées dans cette gamme de temps, notamment
25 pour faciliter un criblage rapide.

Les anticorps spécifiques des polymorphismes des protéines STOP peuvent être utilisés dans des immunoessais de criblage, plus particulièrement pour détecter la liaison de substrat ou de protéine STOP ou pour confirmer l'absence ou la présence d'une protéine STOP dans une cellule ou un échantillon, tel qu'un échantil-
30 lon biologique.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, ladite mesure est effectuée par détection de la variation d'intensité d'un signal

électrique ; en effet, on peut observer en ce qui concerne les cellules nerveuses des animaux recombinants selon l'invention, une altération de l'organisation de la synapse (positionnement et transport de neurorécepteurs) chez les animaux recombinants selon l'invention.

5 La présente invention est également relative à un procédé de criblage et de sélection de molécules utiles dans le traitement de l'anxiété, la schizophrénie et des désordres schizoaffectifs à composante anxieuse, paranoïaque ou dépressive, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend :

- l'administration à au moins un mammifère non-humain recombi-
10 nant porteur d'au moins un allèle modifié du gène codant une protéine STOP d'au moins une substance à cribler ; et

- l'étude comportementale dudit mammifère par rapport à une série d'animaux témoins et/ou la détermination de la localisation des médicaments après leur administration.

15 De tels animaux peuvent avantageusement servir de modèles pour le criblage de molécules psychoactives, présentant une faible toxicité chez l'homme.

La présente invention a également pour objet un vecteur de recombinaison homologue d'un gène codant pour une protéine STOP, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique d'un gène STOP modifié codant pour une
20 protéine STOP inactivée, de préférence tronquée au niveau d'au moins l'un des exons, notamment l'exon 1.

La présente invention a également pour objet une méthode de production de mammifères non-humains recombinants porteurs d'au moins un allèle du gène codant pour une protéine STOP inactivée, caractérisée en ce que :

25 - l'on tronque un allèle du gène codant pour une protéine STOP ;
- l'on introduit ladite séquence modifiée dans un segment de l'ADN génomique d'un mammifère non-humain du même type, associé à un marqueur approprié, de manière à obtenir une séquence marquée M, contenant ledit allèle modifié ;

30 - l'on intègre ladite séquence M, *in vitro*, dans les cellules souches de lignées germinales d'embryons d'un mammifère non-humain par transfection et on

sélectionne les cellules ayant ledit allèle par des événements de recombinaison homologue ; puis

- l'on réinjecte lesdites cellules souches sélectionnées à un embryon réimplanté chez un mammifère non-humain du même type afin d'obtenir des animaux chimériques ; et

- l'on obtient à la génération F1 des mammifères non-humains recombinés hétérozygotes et à la génération F2 des mammifères non-humains recombinés homozygotes STOP $-/-$, reconnaissables à la présence du marqueur et des souris dites sauvages $(+/+)$.

La présente invention a également pour objet l'utilisation des substances sélectionnées à l'aide du procédé de criblage tel que défini ci-dessus, pour la préparation d'un médicament utile dans le traitement de la schizophrénie et des désordres schizoaffectifs à composante anxieuse, paranoïaque ou dépressive.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre du procédé objet de la présente invention, avec référence aux dessins annexés dans lesquels :

- la figure 1 illustre l'organisation génomique du gène STOP au niveau de l'exon 1 et l'établissement de souris *knock-out* pour le gène STOP [souris STOP KO $(-/-)$] par altération de l'exon 1. **A** : carte de restriction d'un fragment du gène STOP (allèle sauvage) utilisé pour la production d'un fragment génomique d'homologie, structure du vecteur de recombinaison homologue ou vecteur de ciblage ptSTOP, et structure prédite de l'allèle mutant. EV : EcoRV ; EI : EcoRI ; TK : thymidine kinase ; pgk : phosphoglycérate kinase ; néo : néomycine ; NTR : Nucleotide Translation Region. **B** : profils Southern blot du gène STOP chez des souris sauvages $(+/+)$; 8 kb) et hétérozygotes $(+/-)$; 5,3 kb),

- la figure 2 représente la séquence du gène STOP au niveau de l'exon 1 (positions 3333-5150) (clone génomique de 7,2 kb) ; les fragments utilisés pour l'établissement des souris STOP KO $(-/-)$, sont les suivants : séquence homologue en 5' : 4,118 kb, positions 1-4118 ; séquence homologue en 3' : 1,57 kb, positions 5131 à 6701.

- figure 3 : la figure 3A représente la séquence génomique du gène STOP, située en 5' par rapport à la séquence de la figure 2, et la figure 3B représente la sonde utilisée pour le criblage, qui est un fragment EcoR V-EcoR I (positions 701-1881 sur la figure 3A).

5 - la figure 4 illustre l'analyse en *Western-blot*, à l'aide de l'anticorps polyclonal 23C (Laurent Guillaud et al., précité), de l'expression des protéines STOP (E-STOP et N-STOP) dans le cerveau des souris STOP KO (-/-) ou sauvages. Cette figure montre l'absence de protéines STOP dans le cerveau des souris STOP KO (-/-), par comparaison avec les souris de type sauvage ; la présence d'une quantité
10 équivalente de protéines dans les deux types d'échantillons déposés sur le gel est démontrée par le signal obtenu avec un anticorps anti-tubuline β (β -tub).

- les figures 5 à 8 illustrent l'altération de la dépression à long terme (LTD pour *long-term depression*) et de la potentialisation à long terme (LTP pour *long-term potentiation*) chez les souris STOP KO (-/-) :

15 - la figure 5 illustre la réponse synaptique basale des collatérales de Schaffer : les courbes du type "entrée-sortie" représentent la pente de la courbe du potentiel d'excitation post-synaptique (EPSP pour *excitatory post-synaptic potential*) en fonction de l'excitabilité des fibres des collatérales de Schaffer, à partir d'une coupe de souris de type sauvage (a) ou de souris STOP KO (-/-) (b). Résumé des résultats
20 obtenus sur six souris de type sauvage et six souris STOP KO (-/-) (c). Les pentes des courbes ne sont pas significativement différentes, indiquant une transmission synaptique basale normale chez les souris STOP KO (-/-),

- la figure 6 illustre les résultats des expériences de potentialisation à long terme (LTP pour "*Long-term potentiation*") au niveau des synapses des
25 collatérales de Schaffer et des cellules pyramidales de la région CA1 de l'hippocampe :

- la figure 6(a) montre qu'une stimulation à une fréquence élevée (stimulation tétanique induite par 4 stimuli de 100 Hz pendant 1 s, appliqués à des intervalles de 10 à 20 s) entraîne une augmentation à long terme de la pente de la courbe du EPSP, dans
30 une coupe de souris de type sauvage,

- la figure 6(b) montre qu'en revanche, une stimulation identique entraîne uniquement une faible augmentation de la pente de la courbe du EPSP dans une coupe de souris STOP KO (-/-), et
- la figure 6(c) représente un résumé des résultats obtenus chez les souris de type sauvage et les souris STOP KO (-/-). Les valeurs initiales des pentes des courbes du EPSP ont été normalisées dans chaque expérience, en utilisant la valeur moyenne de la courbe obtenue pendant la période témoin (-10 à 0 min). Les résultats exprimés en moyenne \pm s.e.m., correspondent aux valeurs obtenues sur 13 et 9 coupes issues respectivement de sept souris de type sauvage et six souris STOP -/-. Ces résultats montrent un déficit significatif de la potentialisation à long terme chez les souris STOP KO (-/-) ($p = 0,0007$ mesure enregistrée au bout de 30 à 40 minutes),
- la figure 7 illustre les résultats des expériences de dépression à long terme (LTD) au niveau des synapses des collatérales de Schaffer et des cellules pyramidales CA1 :
- la figure 7(a) montre que la stimulation à basse fréquence (LFS pour *low frequency stimulation*, 1Hz pendant 15 min) induit une diminution à long terme de la pente de la courbe du EPSP dans les coupes de souris de type sauvage,
- la figure 7(b) montre qu'en revanche, la stimulation à basse fréquence n'induit pas de diminution à long terme de la pente de la courbe du EPSP dans les coupes de souris KO -/-, et
- la figure 7(c) représente un résumé des expériences de LTD dans les souris STOP KO (-/-) et dans les souris de type sauvage. Les résultats exprimés en moyenne \pm s.e.m., correspondent aux valeurs obtenues sur 15 et 9 coupes de respectivement neuf souris de type sauvage et six souris STOP KO (-/-). Ces résultats montrent une altération significative de la dépression à long terme (LTD) dans les souris STOP KO (-/-) ($p=0,01$, résultats enregistrés au bout de 40-45 minutes).
- la figure 8A illustre le rapport NMDA/AMPA au niveau des synapses des collatérales de Schaffer et des cellules pyramidales CA1 correspondant au rapport des valeurs des courbes du EPSP du récepteur du NMDA (N-méthyl-D-aspartate) et du récepteur de l'AMPA (alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole acide propionique) sur 14 et 9 coupes de respectivement, six souris de type sauvage et six souris STOP KO (-/-). Les pentes des récepteurs du NMDA et de l'AMPA ont été

mesurées pour une intensité de stimulus correspondant à 2 fois la valeur seuil. Aucune différence significative n'a été observée entre les souris de type sauvage et les souris STOP KO (-/-).

- la figure 8B illustre la dépolarisation pendant une stimulation
5 tétanique des collatérales de Schaffer : le graphique représente le résumé des résultats de quantification de la dépolarisation pendant une stimulation tétanique. La dépolarisation est calculée 300 ms après le début du premier stimulus de 100 Hz. Les expériences ont été réalisées sur 11 coupes de souris de type sauvage et 8 coupes de souris STOP KO (-/-) provenant de respectivement sept souris de type sauvage et six
10 souris STOP KO (-/-). Les résultats ne sont pas significativement différents chez les souris de type sauvage et les souris STOP KO (-/-).

- la figure 9 illustre l'altération de la plasticité synaptique à court terme chez les souris STOP KO (-/-) :

- la figure 9A illustre les résultats des expériences de potentialisation post-tétanique de
15 la transmission synaptique des collatérales de Schaffer. Une stimulation à haute fréquence en présence de l'antagoniste du récepteur NMDA, D-APV (50-100 μ M) induit une augmentation transitoire de la pente du EPSP. Les résultats ont été obtenus à partir de 6 et 10 coupes provenant de respectivement quatre souris de type sauvage et cinq souris STOP KO (-/-). Les résultats montrent une altération de la
20 potentialisation post-tétanique chez les souris STOP KO (-/-) ($p=0,04$, mesures effectuées de 0 à 30 s après la stimulation tétanique),

- la figure 9B illustre les résultats des expériences de facilitation par stimulations
couplées (PPF for *paired pulse facilitation*), de la transmission synaptique des collatérales de Schaffer. Les résultats obtenus correspondent à 7 et 12 coupes
25 provenant de respectivement quatre souris de type sauvage et cinq souris STOP KO (-/-). La facilitation par stimulations couplées n'est pas modifiée de façon significative chez les souris STOP-/-, et

- la figure 9C illustre les expériences de facilitation de fréquence des fibres moussues de l'hippocampe. Les résultats ont été obtenus à partir de 10 et 12 coupes obtenues à
30 partir de 7 et 8 coupes provenant de respectivement six souris de type sauvage et sept souris STOP KO (-/-). Dans les souris de type sauvage, une stimulation répétée des synapses de la fibre moussue en utilisant des fréquences de stimulation comprises

entre 0,033 et 1 Hz, a provoqué une augmentation réversible, d'un facteur 3, de l'amplitude de la réponse de la fibre moussue. La facilitation est altérée de façon significative chez les souris STOP KO (-/-) ($p=0,03$, valeurs enregistrées à une fréquence de stimulation de 1 Hz).

5 - la figure 10 illustre les troubles du comportement maternel des souris STOP KO (-/-) :

- figure 10a : la survie des nouveaux-nés, issus de mères primipares, portant l'allèle STOP sauvage ou muté (STOP -/-), est analysée au deuxième jour après la naissance,

- figures 10b et 10c : la manifestation d'un comportement maternel est analysée chez
10 les jeunes femelles primipares et les jeunes mâles STOP KO (-/-), par comparaison avec les souris de type sauvages. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm s.e.m ; $n = 9$ pour les souris femelle de type sauvage et STOP KO (-/-) et $n = 10$ pour les souris mâle de type sauvage et STOP KO (-/-).

- la figure 11 illustre les troubles du comportement chez les souris
15 STO KO (-/-) ; les activités des souris (dormir, manger, faire sa toilette, marcher et rester immobile tout en étant éveillé) ont été enregistrées en vidéo pendant une durée de 3 heures, $n = 11$ pour les souris de type sauvage (wt pour *wild-type*) et les souris STOP KO (-/-) :

- figure 11a : temps consacré à chaque activité. Chaque boîte correspond à une activité
20 différente, comme indiquée dans le panneau de gauche. Les souris STOP KO (-/-) passent plus de temps à marcher et à rester immobiles que les souris de type sauvage, au détriment du temps passé à dormir ou à manger,

- figure 11b : nombre de changements d'activité. Par rapport aux souris de type sauvage, les souris STOP KO (-/-) montrent un nombre plus élevé de changements
25 d'activités, avec un nombre plus élevé de phases de marche et de repos,

- figure 11c : pourcentage des phases de toilette suivies d'une phase de sommeil (GS) sur nombre total de phases de sommeil (S) exprimées en moyenne \pm s.e.m. Les pourcentages sont calculés pour chaque souris avant de calculer la moyenne. La séquence G-S typique chez les souris de type sauvage est fréquemment interrompue
30 chez les souris STOP KO (-/-).

- la figure 12 illustre l'état d'anxiété des souris STOP KO (-/-), évalué par le test de lumière et d'obscurité. figure 12a : le temps passé dans la boîte

éclairée et figure 12b : le nombre de passages entre les deux boîtes sont respectivement enregistrés sur une durée de 5 minutes, à partir de la première entrée des animaux dans la boîte obscurcie. Les souris sauvages (+/+) sont utilisées comme témoins. Les valeurs correspondent à valeur moyenne \pm erreur standard à la moyenne
5 (s.e.m). Les différences entre les souris KO et les souris témoins sont indiquées avec un risque $p < 0,01$ (**).

- la figure 13 illustre les troubles de la mémoire à court terme des souris STOP KO (-/-), évalués par le test de reconnaissance d'un objet. Les souris sauvages (+/+) sont utilisées comme témoins. Les résultats sont exprimés par l'indice
10 de reconnaissance (RI) : les valeurs de RI significativement supérieures à 50% correspondent à un test de reconnaissance positif. Les valeurs correspondent à la valeur moyenne \pm erreur standard à la moyenne (s.e.m).

- la figure 14 illustre le comportement social des souris STOP KO (-/-) ; les souris sauvages (+/+) sont utilisées comme témoins : figure 15a : évaluation
15 du temps passé par un mâle à l'investigation sociale, vis-à-vis d'un intrus [n=11 pour les souris sauvages et n=13 pour les souris STOP KO (-/-)] ; figure 15b : agression inter-mâle ; les tests d'agression sont réalisés pendant deux jours consécutifs [n=11 pour les souris sauvages et n=10 pour les souris STOP KO (-/-)] ; le nombre d'agressions et le temps passé à combattre (moyenne \pm erreur standard à la moyenne
20 (s.e.m)) sont enregistrés le deuxième jour ; * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, test U Mann-Whitney.

- la figure 15 illustre l'effet des neuroleptiques sur le comportement maternel chez les souris STOP KO (-/-) :

- figure 15A : Réinstallation au nid des nouveaux-nés issus de femelles post-partum de
25 type sauvage (wt) et STOP KO (-/-). La réinstallation des souriceaux au nid a été testée pendant le premier jour post-partum, chez les souris traitées avec des neuroleptiques (mélange d'halopéridol et de chlorpromazine), un anxiolytique (diazépam) ou non-traitées. Les souris ont reçu une dose de 0,5 mg/kg/jour de 6-8 jours avant l'accouchement jusqu'au jour de l'accouchement. Les femelles ont été
30 mises en présence de 3 nouveaux-nés et la réinstallation au nid a été enregistrée pour chaque femelle. La moyenne des valeurs obtenues est présentée pour chaque génotype (moyenne \pm s.e.m., n = 6 pour chaque groupe de souris de type sauvage et STOP KO

(-/-). * $p < 0,05$, ** $p < 0,02$, *** $p < 0,01$, Test U de Mann et Whitney non paramétrique.

- figure 15B : Survie des nouveaux-nés chez les souris de type sauvage et les souris STOP KO (-/-). La survie des nouveaux-nés est analysée chez les souris STOP KO (-/-) soumises à différents traitements. Les nouveaux-nés sont considérés comme survivants lorsqu'ils sont élevés jusqu'au sevrage. Aucune survie des nouveaux-nés n'a été observée chez les souris STOP KO (-/-) non-traitées ($n = 20$) ou traitées à court terme (figure 15A). En revanche, une survie des nouveaux-nés est observée chez quatre des sept souris STOP KO (-/-) traitées à long terme (4 mois) avec des neuroleptiques. Une survie des nouveaux-nés est observée chez toutes les souris de type sauvage ($n = 7$) soumises au même traitement à long terme avec des neuroleptiques. * $p < 0,05$, ** $p < 0,02$, *** $p < 0,01$, test exact de Fisher.

Exemple 1 : Établissement de souris “*Knock out*” (KO) dans lesquelles le gène STOP est inactivé : souris STOP KO (-/-)

1- Matériels et méthodes

1-1 Construction du fragment génomique d'homologie et du vecteur de recombinaison homologue (vecteur de ciblage).

Les fragments d'ADN génomique, utilisés pour construire le vecteur de recombinaison homologue sont issus d'une banque d'ADN génomique de souris de souche 129 clonée dans le phage P1 et criblée par hybridation avec un ADNc du gène STOP ou une sonde d'ADNc dudit gène (Eric Denarier et al., B.B.R.C., 1998, précité).

Le fragment génomique d'homologie du gène STOP est construit à partir du clone de 7,2 kb dont la séquence est présentée à la figure 2, selon les étapes suivantes : un fragment de 1012 pb, contenant les séquences répétées de la région codante du gène STOP qui s'étend des positions 4118 à 5131 de la séquence présentée à la figure 2, a été délété et remplacé par une cassette d'expression contenant le gène de résistance à la néomycine (*neo*) sous le contrôle du promoteur PGK et le gène de la β -galactosidase (*lacZ*) sous le contrôle transcriptionnel du promoteur STOP endogène. En outre, un site EcoRV a été introduit en 5' du gène *lacZ*.

Le vecteur de recombinaison homologue (ptSTOP) est obtenu par clonage du fragment d'homologie du gène STOP précédemment décrit dans le vecteur

pGK-TK. Le vecteur pGK-TK dérive du vecteur pPNT construit par Tybulewicz et al. (Cell, 1991, 65, 1153-1163) par insertion du gène de la thymidine kinase du virus de l'Herpès simplex (HSV) sous le contrôle du promoteur de la phosphoglycérate kinase (PGK).

5 1-2 Recombinaison homologue dans les cellules ES et génotypage

Le vecteur ptSTOP est linéarisé par l'enzyme NotI et électroporé dans des cellules ES (ES-R1, A. Naguy et al., P.N.A.S., 1993, **90**, 8428-8428) ou dans les cellules ES-AT1 isolées à partir de blastocystes de 3,5 jours issus de souris F1 (129 Sv Pas × 129 Sv Pas). Ensuite, les cellules ES électroporées sont ensemencées sur une
10 couche de fibroblastes résistants à la néomycine, préalablement traités à la mitomycine, et cultivées dans du milieu DMEM riche en glucose (INVITROGEN) contenant 15 % de sérum de veau foetal et 1000 UI/ml de facteur inhibiteur de leucémie (Esgron, CHEMICON). 2 jours après la transfection, de la généticine (G418, INVITROGEN) est ajoutée dans le milieu de culture, à la concentration finale de 250
15 µg/ml. Le gancyclovir (SYNTEX) est ajouté du quatrième au huitième jour après la transfection. Les clones de cellules ES recombinantes sont prélevées 10 jours après la transfection et amplifiées avant d'être congelées ou analysées. Le génotype des clones résistant au G418 et au gancyclovir est vérifié par analyse en Southern blot de l'ADN génomique digéré par EcoRV et hybridé avec une sonde spécifique du gène STOP,
20 située dans la région 5' flanquant la région de recombinaison homologue (voir figure 3) et correspondant aux positions 698-1875, après digestion EcoRV-EcoRI de la figure 3. La taille des fragments de restriction est de 8 kb pour l'allèle sauvage et de 5,3 kb pour l'allèle muté (Figure 1B).

25 1-3 Microinjection des cellules ES recombinantes et obtention de souris transgéniques homozygotes pour l'allèle muté du gène STOP [souris STOP KO (-/-)].

Les cellules ES recombinantes portant l'allèle muté sont microinjectées dans des embryons de souris OF1 au stade morula, puis les embryons injectés sont réimplantés dans l'utérus de la mère porteuse pour donner naissance à
30 des souris chimères (*Gene targeting : a practical approach*, A. L. Joyner Ed., New York, Oxford University Press, 1993, pages 174-179). Le croisement de ces chimères avec des souris BalB/c ou 129/sv (Laboratoires CHARLES RIVER) produit des

descendants F1 hétérozygotes, dans lesquels la transmission de la mutation du gène STOP est vérifiée par analyse en Southern blot de l'ADN génomique provenant d'un échantillon de queue. Les descendants F1 sont croisés entre eux pour donner des descendants F2 homozygotes.

5 1-4 Analyse en Western-blot de l'expression du gène STOP dans le cerveau des souris STOP KO (-/-)

Des extraits de cerveaux de souris STOP KO (-/-) et de souris de type sauvage sont préparés et analysés en Western-blot à l'aide de l'anticorps polyclonal 23C, selon les protocoles décrits dans Guillaud et al. , précité.

10 1-5 Analyse histologique, immunomarquage des protéines STOP et détection de l'activité β -galactosidase du cerveau des souris STOP KO (-/-)

a) analyse histologique

Des souris mâle sauvages et STOP KO (-/-) âgées de 10 à 12 semaines sont perfusées avec une solution de paraformaldéhyde (PFA 4 %). Les
15 cerveaux sont fixés dans la même solution, pendant 2h à 4°C. Un test de détection de la cytochrome oxydase (Y. Liu et al., J. Neurosci. Methods, 1993, 49, 181-184) et une coloration au cristal violet sont effectués sur des coupes de 100 μ m des cerveaux.

b) immunomarquage des protéines STOP

Les cerveaux sont préparés comme décrit au paragraphe a) puis
20 congelés dans du saccharose (20% dans PBS). Des coupes de cerveau de 20 μ m sont incubées successivement dans les solutions suivantes : 1 % H_2O_2 (15 min), 3 % de BSA (30 min) et mélange de l'anticorps polyclonal 23C (100 μ g/ml) et du conjugué anti-anticorps de lapin couplé à la peroxydase (une nuit), puis les protéines STOP sont révélées par l'éthylcarbazole (AEC, DAKO).

25 c) détection de l'activité β -galactosidase

Des coupes de cerveaux (100 μ m) sont fixées dans 0,2 % de glutaraldéhyde et 2% de formaldéhyde. L'activité β -galactosidase est détectée par coloration des coupes dans une solution de PBS contenant 5 mM de ferricyanure de potassium, 5 mM de ferrocyanure de potassium, 2 mM de chlorure de magnésium et 1
30 mg/ml de X-Gal, à 30°C, pendant 3 à 5 heures.

1-6 Analyse de la stabilité des microtubules dans les neurones et les cellules gliales des souris STOP KO (-/-)

Des neurones et des cellules gliales d'embryons de souris de type sauvage et de souris STOP KO (-/-) sont maintenues à température ambiante ou
5 soumises à une température de 0° C pendant 45 minutes. Après extraction de la tubuline libre, selon le protocole décrit dans Laurent Guillaud et al., précité, les microtubules sont colorés avec un anticorps anti-tubuline et les noyaux sont colorés par la solution de Hoechst.

2- Résultats

10 2-1 Etablissement de souris STOP KO (-/-)

Le profil génotypique du mutant homozygote STOP KO (-/-) montre la présence d'un fragment de 5,3 kb (figure 1B) qui indique la délétion du fragment de 1012 pb contenant les séquences répétées de la région codante du gène STOP.

15 L'analyse des différents croisements hétérozygotes montre que l'allèle STOP muté est transmis de manière mendélienne.

Les souris homozygotes STOP KO (-/-) sont viables, apparaissent en bonne santé et ne présentent pas de lésions macroscopiques visibles.

On obtient un phénotype nul ; les souris portant l'allèle muté à l'état homozygote n'expriment pas de protéine STOP :

20 - l'analyse des extraits de cerveaux des souris STOP KO (-/-), en Western-blot à l'aide de l'anticorps polyclonal 23C (Guillaud et al., précité), montre une absence de protéines STOP (E-STOP et N-STOP) chez ces souris alors que ces deux isoformes sont détectées chez les souris adultes de type sauvage (figure 4).

- l'analyse immunohistologique des coupes de cerveaux des souris
25 STOP KO (-/-) montre une absence de marquage spécifique des protéines STOP (E-STOP et N-STOP) chez ces souris alors qu'un marquage spécifique de ces protéines STOP est observé dans l'ensemble des tissus nerveux des souris adultes de type sauvage.

2-2 Absence de stabilité au froid des microtubules de cellules issues de souris STOP KO (-/-)

Du fait de l'absence de protéine STOP chez les souris STOP KO (-/-), on observe une dépolymérisation des microtubules après exposition au froid, à la fois
5 dans les neurones, les cellules gliales ou les fibroblastes.

2-3 Absence de lésions anatomiques dans le cerveau des souris STOP KO (-/-)

L'analyse en microscopie optique, de l'anatomie du cerveau des souris STOP KO (-/-), à partir de coupes parasagittales colorées au cristal violet pour
10 visualiser les noyaux, ne montre pas de différences entre les souris KO -/- et les souris de type sauvage.

Plus précisément :

- l'analyse des couches de cellules du cervelet, du néocortex, de l'hippocampe et du bulbe olfactif qui correspondent à celles montrant une expression
15 importante des protéines STOP chez les souris de type sauvage, montre une organisation parfaitement normale chez les souris KO -/-,

- l'examen du cortex somato-sensoriel, à partir de coupes tangentielles colorées pour mettre en évidence l'activité cytochrome oxydase, a montré une organisation normale des champs de tonneaux chez les souris KO -/-,

20 - le profil d'expression de la β -galactosidase dans le cerveau des souris STOP KO (-/-) est identique à celui observé chez les souris hétérozygotes ce qui démontre que les cellules qui, à l'état normal, expriment des quantités importantes de protéines STOP sont encore présentes chez les souris STOP -/-.

Les souris homozygotes STOP(-/-) qui ne présentent pas de lésions
25 anatomiques du cerveau détectables en microscopie, présentent cependant des troubles du comportement.

Exemple 2: Analyse électrophysiologique de la transmission synaptique chez les souris KO STOP -/-

1-Matériels et méthodes

30 Pour la préparation des coupes d'hippocampe, des souris âgées de 1 à 3 mois ont été profondément anesthésiées avec du nembutal. Des coupes de cerveau (300-400 μ m) ont été réalisées dans un liquide céphalo-rachidien artificiel (124 mM

NaCl, 26 mM NaHCO₃, 2,5 mM KCl, 1,25 mM NaH₂PO₄, 2,5 mM CaCl₂ et 1,3 mM MgCl₂), à une température comprise entre 4°C et 8°C. De manière plus précise : les coupes ont été maintenues à température ambiante pendant au moins 1 h puis elles ont été submergées dans une chambre contenant du liquide céphalo-rachidien artificiel
5 équilibré avec 95 % d'O₂ et 5 % de CO₂ et transférées dans une chambre de superfusion.

Le potentiel d'excitation post-synaptique (EPSP) des champs extracellulaires a été enregistré à l'aide de microélectrodes (1 à 3 MΩ) remplies de liquide céphalo-rachidien artificiel. Les mesures ont été effectuées à une température
10 d'environ 22 à 25°C. Des électrodes bipolaires en acier ont été utilisées pour stimuler la collatérale de Schaffer et la fibre moussue (stimulation de 10 à 100 mA, pendant 0,1 ms avec des intervalles de 10 à 30 s entre chaque stimulation).

Pour toutes les analyses effectuées dans la région CA1, les électrodes de stimulation et les électrodes de mesure extracellulaire ont été placées
15 dans le *stratum radiatum* et de la picrotoxine (concentration finale de 100 μM, SIGMA) a été ajoutée au liquide céphalo-rachidien artificiel. Dans ces séries d'analyses, la région CA1 a été séparée de la région CA3 par section au couteau de la coupe de cerveau, avant la mesure.

Pour les courbes du type entrée-sortie, l'excitabilité des fibres a été
20 analysée après blocage de l'activation du récepteur au glutamate par l'antagoniste du récepteur de l'AMPA (alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole acide propionique), NBQX (5 à 10 μM, TOCRIS). Les réponses du récepteur de l'AMPA ont été mesurées puis les réponses du récepteur du NMDA (N-méthyl-D-aspartate) ont été révélées après suppression du magnésium extra-cellulaire et isolées par l'addition
25 de NBQX (10 μM), afin d'effectuer une analyse quantitative.

Pour les analyses de type potentialisation post-tétanique (PTP) une dose élevée de D-APV (50 à 100 μM ; fourni par TOCRIS) a été ajoutée dans la solution du bain, au moins 10 minutes avant le choc tétanique.

Pour les expériences de stimulations couplées, les collatérales de
30 Schaffer ont été stimulées de façon répétée par deux stimuli de même intensité séparés par de courts intervalles de durée variable. Le résultat est exprimé par le rapport entre

l'amplitude de la réponse au second stimulus et au premier stimulus, déterminé à partir d'une moyenne de 15 à 20 réponses, pour chaque valeur de l'intervalle.

Les réponses des fibres moussues ont été analysées par l'application d'un bain de l'agoniste sélectif du récepteur au glutamate, DCG IV (groupe
5 métabotropique de type 2). Les effets inhibiteurs du DCG IV (10 mM, fourni par TOCRIS) sur les entrées dans les fibres moussues sont similaires chez les souris de type sauvage et les souris STOP KO (-/-). NBQX (5 à 10 mM) a été appliqué à la fin de chaque analyse de la fibre moussue, afin de déterminer l'excitabilité de ces fibres.

L'acquisition des données et l'analyse des expériences de
10 potentialisation à long terme (LTP) et de dépression à long terme (LTD) ont été effectuées en aveugle, relativement au génotype des souris. Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm écart standard à la moyenne (s.e.m).

2- Résultats

Le fonctionnement des synapses des souris STOP KO (-/-) a été
15 analysé dans l'hippocampe où l'expression des protéines STOP est importante.

Tout d'abord, afin d'analyser sélectivement la transmission glutamatergique, la transmission synaptique dans la région CA1 de l'hippocampe a été analysée en présence de picrotoxine, un antagoniste du récepteur du GABA de type A.

La transmission synaptique basale a été évaluée par l'analyse de la
20 relation entre l'excitabilité des fibres des collatérales de Schaffer et l'amplitude des potentiels d'excitation post-synaptiques dans la région CA1 de l'hippocampe. L'analyse a été effectuée pour différentes intensités de stimulus. Les courbes du type entrée-sortie sont qualitativement similaires chez les souris STOP KO (-/-) et les souris de type sauvage (figures 5a et 5b). L'analyse quantitative effectuée sur les
25 pentes des courbes entrée-sortie de six souris de type sauvage et de six souris KO STOP -/- ne montre aucune différence entre les 2 groupes de souris (figure 5c), indiquant une transmission synaptique basale normale chez les souris STOP -/-.

Pour l'analyse de la plasticité synaptique, la réponse synaptique à un stimulus standard est évaluée par la pente de la courbe d'EPSP. Les valeurs basales
30 des pentes sont déterminées par des stimulations répétées à basse fréquence (0,03-0,1 Hz). Au temps zéro, un protocole de stimulation de conditionnement est appliqué.

L'adaptation synaptique est mise en évidence par une déviation stable des valeurs des pentes d'EPSP, par rapport aux valeurs basales.

Un protocole de conditionnement à une fréquence élevée (100 Hz), appliqué à la synapse collatérale de Schaffer-cellule pyramidale de la région CA1, produit une augmentation stable des pentes des courbes, dans les coupes des souris de type sauvage (figure 6a), indiquant une potentialisation synaptique chez ces souris. Cette potentialisation a persisté plus de 30 minutes, et une telle persistance représente une potentialisation à long terme (LTP).

Chez les souris KO STOP (-/-) on observe une plus faible potentialisation de la transmission synaptique (figure 6b).

Cette différence est confirmée par l'analyse quantitative de l'ensemble des résultats obtenus dans les 2 groupes de souris (figure 6c).

La dépression à long terme (LTD) a été analysée au niveau des mêmes synapses des collatérales de Schaffer et des cellules pyramidales CA1. Le protocole classique de stimulation à basse fréquence a été utilisé (LFS, 900 stimulations de 1 Hz). Des coupes de souris STOP KO (-/-) ont montré une diminution significative de l'amplitude de LTD (figure 7b).

Ces résultats montrent que la LTP et la LTD sont altérées chez les souris STOP KO (-/-).

La LTP et la LTD dépendent de façon cruciale de l'activité du récepteur du NMDA. Toutefois, l'activité basale du récepteur du NMDA, mesurée par le rapport de la réponse NMDA/AMPA aux stimuli (figure 8A) et l'activation du récepteur NMDA pendant la stimulation tétnique (figure 8B) sont comparables chez les souris STOP KO (-/-) et les souris de type sauvage.

Ces résultats démontrent un déficit dans les 2 formes majeures de plasticité synaptique (LTP et LTD) chez les souris STOP KO (-/-) et indique que ce déficit n'est pas lié à un défaut d'expression du récepteur NMDA chez les souris STOP KO (-/-).

La figure 9B montre que chez les souris STOP KO (-/-), la potentialisation synaptique est altérée pendant les premières minutes après la stimulation tétnique ainsi qu'à des instants plus tardifs. En conséquence, l'existence d'un déficit éventuel de plasticité à court terme, au niveau des synapses des

collatérales de Schaffer et des cellules pyramidales CA1, a été analysée par les mesures de la potentialisation post-synaptique (PTP) et de la facilitation par des stimulations couplées (PPF). Comme la LTP, la PTP est une forme de potentialisation suite à une stimulation tétanique (stimulus d'1 Hz pendant 1 s) mais elle est induite en présence de l'antagoniste du récepteur NMDA (D-APV) pour bloquer des événements post-synaptiques impliqués dans la LTP, et persiste seulement pendant quelques minutes, suite à la stimulation tétanique. La PPF est une autre forme de plasticité synaptique observée lorsque les synapses sont stimulées par des stimulations couplées. La PPF est définie par une augmentation de la réponse synaptique en réponse au second stimulus. La PTP est réduite chez les souris STOP KO (-/-) (figure 9A). En revanche, la facilitation par stimulations couplées (PPF) est similaire chez les souris de type sauvage et les souris STOP KO (-/-) (figure 9B), et cela pour une gamme étendue de valeurs décroissantes de la concentration en calcium extracellulaire.

La plasticité synaptique au niveau des synapses des fibres moussues et des cellules pyramidales de la région CA3 a ensuite été analysée. Aucune différence dans la potentialisation à long terme (LTP) ainsi que dans la facilitation par stimulations couplées (PPF), n'a été observée entre les souris STOP KO (-/-) et les souris de type sauvage. Pour étudier la plasticité à court terme, les fibres moussues ont été stimulées par des fréquences croissantes allant de 0,033 à 1 Hz. Ce protocole induit normalement une augmentation importante et transitoire de l'amplitude de la réponse des fibres moussues, un phénomène dénommé facilitation de fréquence. L'amplitude de la facilitation de fréquence a été significativement diminuée chez les souris STOP KO (-/-), par comparaison avec les souris de type sauvage (figure 9C).

L'ensemble de ces résultats montre que plusieurs formes distinctes de la plasticité à long terme et à court terme sont altérées dans différentes régions de l'hippocampe, chez les souris STOP KO (-/-).

Exemple 3 : Analyse des troubles du comportement des souris KO STOP -/-

1- Matériels et méthodes

Tous les tests de comportement ont été effectués sur des portées de souris STOP KO (-/-) et de souris témoins de type sauvage issues de la même colonie (fond génétique BALBc/129 Sv).

1-1 Tests du comportement maternel (maternage)

Le comportement maternel est apprécié par la réalisation des gestes suivants :

1. préparer un nid
- 5 2. réinstaller les nouveaux-nés dans le nid.

Tests effectués chez les femelles nullipares et chez les mâles

De jeunes femelles nullipares âgées de 28 à 49 jours sont élevées individuellement pendant au moins un jour avant le début de l'expérience, puis du coton leur est fourni pour construire un nid.

10 A J1, chaque femelle est mise en présence de 3 nouveaux-nés âgés de 1 à 3 jours de la façon suivante : les nouveaux-nés sont placés chacun dans un des coins de la cage, à distance du nid et au bout de 30 minutes les nouveaux-nés sont remplacés avec leur mère naturelle.

A J2, chaque femelle est à nouveau mise en présence des nouveaux-nés et on évalue, pour chaque femelle, le nombre de souriceaux réinstallés au nid pendant une période de 30 minutes.

Des jeunes mâles âgés de 30 à 45 jours ont été utilisés dans les mêmes conditions que les femelles nullipares à la seule différence qu'ils ont été mis en présence de souriceaux pendant 2 jours consécutifs avant d'être testés à J3, au lieu de

20 J2 pour les femelles nullipares.

Tests effectués chez les mères primipares ou multipares

Des femelles post-partum (seconde gestation) ont été élevées individuellement dès le début de leur gestation. Le jour de l'accouchement, les souriceaux ont été retirés et gardés au chaud pendant une heure. La mère a ensuite été

25 retirée de sa cage habituelle et trois nouveaux-nés ont été placés chacun dans un coin de cette même cage, à distance du nid. Ensuite, la mère a été replacée dans son nid et le nombre de souriceaux réinstallés au nid pendant une période de 20 minutes, a été évalué.

1-2 "Test de lumière et d'obscurité"

30 Le test du choix entre la lumière et l'obscurité, dénommé "test de lumière et d'obscurité", est utilisé pour révéler un état d'anxiété provoqué par un stimulus générateur d'anxiété. Ce procédé, validé par Misslin et al. (1990,

Neuroreport, 1, 267-270), repose sur la tendance naturelle des rongeurs à préférer un environnement sombre, et permet d'évaluer la réponse émotionnelle des animaux soumis à un stress constitué par la lumière.

Les animaux sont entretenus dans des cages individuelles placées
5 dans un incubateur possédant une température comprise entre 21°C et 22°C et un cycle inversé lumière/obscurité de 12h/12h, avec de l'eau et de la nourriture, disponibles à volonté. Toutes les expériences sont réalisées conformément aux directives institutionnelles relatives à l'expérimentation animale.

Le dispositif consiste en deux boîtes de polyvinylcarbonate (20 cm x
10 20 cm x 14 cm) recouvertes de plexiglas. L'une des boîtes est obscurcie et l'autre boîte est éclairée à l'aide d'une lampe de bureau de 100 W placée à une distance de 15 cm (4400 lx). Un tunnel opaque en plastique (5 cm x 7 cm x 10 cm) sépare la boîte obscurcie de la boîte éclairée.

Les animaux sont placés individuellement dans la boîte éclairée avec
15 la tête dirigée vers le tunnel. Le temps passé dans la boîte éclairée (TLB) et le nombre de passages entre les deux boîtes sont enregistrés sur une durée de 5 minutes, à partir de la première entrée des animaux dans la boîte obscurcie.

L'analyse globale des résultats est réalisée en utilisant le test U de
Mann et Whitney. Le risque (p) est fixé à $p < 0,05$. Les résultats sont exprimés par la
20 valeur moyenne \pm erreur standard à la moyenne (s.e.m).

1-3 Test de reconnaissance d'un objet

La mémoire à court terme est évaluée par le test de reconnaissance
d'un objet précédemment décrit (Ennaceur et al., 1988, *Behav. Brain Res.*, 31, 47-59 ;
Dodart et al., 1997, *Neuroreport*, 8, 1173-1178), qui repose sur la tendance naturelle
25 des rongeurs à explorer un nouvel objet, de préférence à un objet familier.

Les animaux sont entretenus dans les conditions telles que décrites à
l'exemple 3, section 1-2.

Le test de reconnaissance d'un objet est réalisé dans un espace
ouvert en plexiglas (52 cm x 52 cm x 40 cm). Le sol est divisé en 9 carrés de taille
30 égale. Les objets à distinguer sont une bille et un dé. Les animaux sont habitués au terrain ouvert pendant 30 min.

Le jour suivant, ils sont soumis à une épreuve d'apprentissage de 10 min (première épreuve) pendant laquelle ils sont placés individuellement dans l'espace ouvert, en présence d'un objet A (dé ou bille). Pendant cette période, sont enregistrés :

- 5 - l'activité locomotrice, évaluée par le nombre de carrés traversés, et
- le temps passé par l'animal à explorer l'objet A, c'est-à-dire le temps pendant lequel le nez de l'animal est dirigé à une distance de l'objet, inférieure à 1 cm.

Trois heures plus tard, ils sont soumis à une épreuve de reconnaissance de 10 min (deuxième épreuve). Pour cette épreuve, l'objet A et l'autre objet (B) sont placés dans l'espace ouvert et l'activité locomotrice, ainsi que la durée d'exploration de l'objet A (t_A) et de l'objet B (t_B) sont enregistrées. Ensuite, l'indice de reconnaissance (RI, en ordonnée à la figure 6) est calculé à partir de la formule suivante $RI = t_A / (t_A + t_B) \times 100$. Un test de reconnaissance est considéré comme positif si la valeur de l'indice de reconnaissance est significativement supérieure à 50 %.

L'analyse globale des résultats est réalisée comme décrit à l'exemple 3, section 1-2.

1-4 Test de comportement social, test de l'intrus

1-4-1 Investigation sociale

20 Le comportement social est évalué sur de jeunes mâles âgés de 4 semaines, isolés pendant une semaine dans une cage (jeunes mâles résidents) ; un intrus mâle élevé en groupe est introduit dans la cage et le temps d'investigation sociale (approche, reniflement, attitude sexuelle) des jeunes mâles résidents est évalué pendant 6 minutes. L'analyse des résultats est réalisée en utilisant le test U Mann et

25 Whitney.

Les résultats sont exprimés par la valeur moyenne \pm erreur standard à la moyenne.

1-4-2 Agression inter-mâle

Des mâles résidents sont isolés pendant un mois et un intrus (mâle élevé en groupe) est placé dans la cage. On mesure le nombre d'attaques et le temps

30 passé à se battre des résidents sur une période de 5 minutes. L'analyse des résultats est

réalisée en utilisant le test U Mann et Whitney. Les résultats sont exprimés par la valeur moyenne \pm une erreur standard à la moyenne.

2-Résultats

2-1 Comportement maternel des souris STOP KO (-/-)

5 Les souris STOP KO (-/-) présentent des défauts majeurs du comportement maternel se traduisant par une absence totale d'intérêt pour leur progéniture, comme le montrent les résultats présentés à la figure 10, obtenus à partir de 161 souriceaux issus de 20 souris femelles STOP KO (-/-) croisées avec des mâles hétérozygotes :

10 - tous les nouveaux-nés, issus de mères primipares STOP KO (-/-) meurent dans les 24 h suivant la naissance par défaut d'attention de la mère (figure 11a), et ce quel que soit leur génotype (fond génétique BALBc/129Sv ou 129Sv). Par comparaison, on observe un taux de survie de 93 % chez les nouveaux-nés issus de mère primipare portant l'allèle sauvage à l'état homozygote [souris sauvages (+/+)]
15 qui présentent un comportement maternel normal comprenant en particulier la préparation d'un nid et la réinstallation des souriceaux dans le nid (figure 11a). Il a également été montré que le comportement maternel des souris STOP KO n'était pas amélioré par des gestations répétées (mères multipares).

- Les souriceaux nés de mère STOP KO (-/-) ne sont jamais
20 cannibalisés et ils sont élevés jusqu'au sevrage lorsqu'ils sont adoptés par des mères de type sauvage, ce qui démontre que la mort des souriceaux est directement liée au génotype de la mère. Pour déterminer les causes de la mort, un défaut de tétée liée à une absence de signal olfactif au niveau des mamelles des femelles STOP KO (-/-) a été recherché. Lorsque les souriceaux issus de mère STOP KO (-/-) sont laissés en
25 présence de leur mère mais replacés, de façon répétée, en position pour être maternés, par une intervention humaine, tous les souriceaux montrent un comportement de recherche et d'attachement à la mamelle. La présence de ce comportement guidé indique que les femelles STOP KO (-/-) possèdent les signaux olfactifs indispensables à l'allaitement. De plus, dans ces conditions, la présence de lait dans l'estomac des
30 souriceaux a été observée. Ces résultats démontrent que la mort des souriceaux n'était pas liée à des défauts de lactation chez les souris STOP KO (-/-).

- Le défaut de réinstallation au nid n'est pas dû à un défaut de reconnaissance olfactive des souriceaux chez les souris STOP KO (-/-) étant donné que les femelles STOP KO (-/-) placées près de leur progéniture, reniflent les souriceaux et de plus montrent un comportement normal dans un test d'olfaction (test de la nourriture cachée).

- Afin de vérifier si le défaut de comportement maternel observé chez les souris STOP KO (-/-) était lié au statut hormonal, des tests complémentaires ont été effectués chez les femelles nullipares et chez les jeunes mâles. Les résultats des tests de réinstallation au nid, effectués chez ces deux groupes de souris montrent un défaut de comportement maternel des souris STOP KO (-/-) mâles ou femelles nullipares (figure 10b, et 10c).

L'ensemble de ces résultats indique que le défaut de comportement maternel observé chez les souris STOP KO (-/-) est indépendant d'un défaut organique manifeste et du statut hormonal de ces souris, ce qui indique qu'il n'est qu'une manifestation des défauts de comportement multiples observés chez ces souris STOP KO (-/-).

2-2 Autres troubles du comportement des souris STOP KO (-/-)

Alors que l'examen de l'état général des souris STOP KO (-/-) ne révèle aucun défaut apparent, elles présentent un comportement étrange avec des phases d'activité intense sans but apparent, accompagnées par de fréquents changements d'activité, au hasard. De manière occasionnelle, les souris présentent une période de crise, d'une durée d'environ 20 min, pendant laquelle les animaux effectuent des cercles ou creusent dans la cage, de manière compulsive. Ces souris traversent également des périodes de prostration apparente pendant lesquelles les souris restent immobiles, ne dorment pas et ne réagissent pas à l'environnement. De telles crises, n'ont jamais été observées chez les souris de type sauvage et ne ressemblent pas à des événements épileptiformes. Les crises aiguës sont difficiles à étudier de façon systématique mais elles représentent des manifestations paroxystiques d'un bruit de fond continu d'anomalies du comportement. L'enregistrement vidéo a été utilisé pour évaluer le comportement des souris de façon quantitative. Le temps passé par les souris à manger, dormir, faire leur toilette, marcher et rester immobiles en étant toujours éveillées a été mesuré pendant une

période de 3 heures, et les résultats sont présentés à la figure 11a. Par rapport aux souris de type sauvage, les souris STOP KO (-/-) passent plus de temps à circuler dans la cage ou à rester immobiles, alors qu'elles sont éveillées, au détriment du temps passer à se nourrir et à dormir. Les souris mutantes présentent des changements
5 d'activités plus importants, en grande partie dus à un nombre significativement plus grand de phases de déplacement sans but et de phases d'immobilité (figure 11a). Les changements d'activité chez les souris STOP KO (-/-) rompent souvent une période d'activité caractéristique. Par exemple, chez les souris de type sauvage, 71% des phases de sommeil sont précédées d'une phase de toilette avec ou sans intercalage
10 d'une phase de tranquillité. La fréquence correspondante chez les souris STOP KO (-/-) est de 47 %, une valeur juste au dessus du bruit de fond attendu dans le cas de séquences d'activité au hasard (35 %, figure 12a). Ces résultats quantitatifs confirment l'impression d'activité non-organisée et non-orientée vers un but, donnée par l'observation des souris STOP KO (-/-).

15 Des analyses complémentaires du comportement des souris STOP KO (-/-) ont été effectuées à l'aide de tests classiques.

Etat d'anxiété des souris STOP KO (-/-)

Les souris STOP KO (-/-) sont effrayées par un stimulus générateur d'anxiété et les souris sauvages (+/+) ont un comportement normal, comme le
20 montrent les résultats du test de stimulation par la lumière (test lumière-obscurité) présentés aux figures 12a et 12b. En outre, il a été montré par des tests préalables, que l'activité locomotrice spontanée des souris mutantes (-/-) n'était pas modifiée comparativement aux souris sauvages (+/+).

- la figure 12a montre que les souris sauvages (+/+) passent
25 beaucoup plus de temps dans la boîte éclairée que les souris STOP KO (-/-) qui restent dans la boîte obscurcie pendant presque toute la durée du test. Les différences observées entre les souris KO (-/-) et les souris sauvages (+/+) sont statistiquement significatives : $p < 0,01$, test U Mann et Whitney.

- la figure 12b montre que les souris sauvages entrent plus fréquem-
30 ment dans la boîte éclairée que les souris STOP KO (-/-). Les différences observées entre les souris STOP KO (-/-) et les souris sauvages (+/+) sont statistiquement significatives : $p < 0,01$, test U Mann et Whitney.

Mémoire à court terme des souris STOP KO (-/-)

Les souris STOP KO (-/-) présentent des troubles de la mémoire à court terme comme le montrent les résultats du test de reconnaissance, présentés à la figure 13 :

5 - l'indice de reconnaissance, mesuré chez les souris sauvages (65 %) est significativement plus élevé que l'indice de 50% observé chez les souris STOP KO (-/-) ($p = 0,004$ pour les souris (+/+), test de Student)..

 - le temps d'exploration des objets A et B, enregistré lors de la deuxième épreuve (épreuve de reconnaissance) montre que les souris sauvages
10 explorent le nouvel objet de préférence à l'objet familier.

 - les souris STOP KO (-/-) n'explorent aucun des objets pendant les deux épreuves (apprentissage et reconnaissance). Elles se déplacent dans l'espace ouvert mais ne sont pas intéressées par les objets. Ce comportement pourrait s'expliquer par leur état d'anxiété comme le montrent les résultats du test de la
15 lumière et de l'obscurité. Cet état d'anxiété est révélé notamment par le fait que les souris se déplacent le long des murs et qu'elles ne traversent pas l'espace ouvert, car elles semblent effrayées par l'environnement et par les objets qui représentent un stimulus générateur d'anxiété.

Comportement social

20 Les souris STOP KO (-/-) présentent des troubles d'investigation sociale (figure 14a, 14b et 14c).

 - La figure 14a montre que le temps passé par les résidents à explorer l'intrus est réduit de manière significative lorsque le résident est un mâle STOP KO (-/-), ($p < 0,05$).

25 - La figure 14b montre que dans le test d'agression inter-mâle, le nombre d'attaques effectuées par les résidents STOP KO (-/-) est inférieur au nombre d'attaques effectuées par les mâles sauvages ($p < 0,01$).

 - La figure 14c montre que le temps passé à se battre par les résidents mâles STOP KO (-/-) est réduit en comparaison des mâles sauvages ($p <$
30 0,01).

Exemple 4: Effet des anxiolytiques et des neuroleptiques sur le comportement maternel des souris STOP KO (-/-)

1-Matériels et méthodes

L'effet des anxiolytiques (diazépam) et des neuroleptiques (chlorpromazine, halopéridol ou clozapine), sur les troubles du comportement des souris STOP KO (-/-), a été évalué dans le test du comportement maternel tel que défini à l'exemple 3 (test de réinstallation au nid).

L'halopéridol (Haldol^R, JANSSEN-CILAG), la chlorpromazine (Largactil^R, RHONE-POULENC) et le diazépam (Valium^R, ROCHE) ont été administrés aux souris dans l'eau de boisson, à la dose de 0,5 mg/kg/jour.

2- Résultats

a) traitement à court terme

L'effet de l'administration à court terme (pendant 6 à 8 jours à partir du 6^{ième} jour précédent l'accouchement) des anxiolytiques (diazépam) et des neuroleptiques (chlorpromazine, halopéridol ou clozapine) sur les troubles du comportement des souris STOP KO (-/-) a été évalué dans le test de réinstallation au nid.

La réinstallation des souriceaux au nid est dramatiquement altérée chez les mères STOP KO (-/-) non-traitées et est faiblement améliorée par l'administration de diazépam (figure 15A). En revanche, les mères STOP KO (-/-) traitées avec des neuroleptiques se comportent aussi bien que les souris de type sauvage (figure 15A). Cependant aucune survie des souriceaux n'a été observée aussi bien chez les souris STOP KO (-/-) traitées ou non-traitées. Ces résultats indiquent un effet bénéfique spécifique mais limité, de l'administration à court terme de neuroleptiques, sur le comportement des souris STOP KO (-/-).

b) traitement à long terme

Sept souris STOP KO (-/-) et sept souris de type sauvage ont reçu une administration quotidienne d'un mélange de chlorpromazine et d'halopéridol, pendant 4 mois, à partir du sevrage et continuant pendant la croissance, l'accouplement avec les mâles, la gestation, l'accouchement et la période post-partum. Les sept souris de type sauvage ont présenté un comportement maternel normal et tous leurs souriceaux ont survécu (figure 15C). De façon remarquable, chez quatre des sept

souris STOP KO (-/-), une amélioration du comportement maternelle a été suffisante pour permettre la survie des souriceaux, avec des rapports survivants/nouveaux-nés de respectivement 3/11, 4/8, 2/4 et 1/5, chez ces quatre souris.

La proportion de souris femelles STOP KO (-/-) avec des souriceaux
5 survivants est significativement plus élevée chez les souris traitées à long terme avec des neuroleptiques (4/7), par rapport aux souris non-traitées (0/20) ou aux souris traitées à court terme avec des neuroleptiques (0/6, figure 15B).

Ces résultats indiquent que l'administration à long terme de neuroleptiques est capable de ré-établir un comportement normal chez les souris
10 STOP KO (-/-), compatible avec la survie des souriceaux.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du
15 cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDICATIONS

1°) Mammifère non-humain recombinant, porteur d'au moins un allèle modifié du gène codant pour une protéine STOP.

2°) Mammifère non-humain recombinant selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit allèle modifié est obtenu à partir d'une construction comprenant une séquence d'acide nucléique issue du même mammifère ou d'un mammifère différent de celui dans lequel ladite construction est insérée, laquelle construction est sélectionnée dans le groupe constitué par des constructions contenant une séquence codant pour une protéine STOP anti-sens, des constructions comprenant la région du promoteur STOP en combinaison avec un gène rapporteur ou avec la région codante STOP, des constructions comprenant au moins une portion du gène STOP incluant au moins une modification, des constructions comprenant au moins une portion du gène STOP liée de manière opérationnelle à un promoteur et éventuellement à d'autres séquences régulatrices nécessaires pour l'expression dans l'animal hôte.

3°) Mammifère non-humain recombinant selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que lesdites constructions sont sélectionnées parmi les constructions suivantes : des constructions qui incluent un fragment de la séquence génomique codant pour une protéine STOP comprise entre le codon d'initiation et le codon STOP, des constructions ne comprenant pas la région comprise entre les positions 4118 et 5131 de la séquence génomique codant pour une protéine STOP, des constructions comprenant 4,1 kb du gène STOP, le gène codant pour la β -galactosidase, placé sous le contrôle du promoteur STOP endogène, un gène de résistance à la néomycine sous le contrôle du promoteur PGK, 1,57 kb de séquence du gène STOP et enfin le gène de la thymidine kinase, sous le contrôle du promoteur PGK.

4°) Utilisation d'un mammifère non-humain recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, pour la sélection ou le criblage de produits psychoactifs.

5°) Molécule d'acide nucléique, caractérisé en ce qu'elle comprend la séquence d'un allèle modifié du gène codant pour une protéine STOP tel que défini

à l'une quelconque des revendications 1 à 3, à l'exclusion des séquences correspondant aux numéros d'accèsion GENBANK AJ002556 et Y16032.

6°) Amorces ou sondes de criblage de clones ES recombinants ou d'animaux recombinants, caractérisées en ce qu'elles sont sélectionnées dans le
5 groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:3 à 6.

7°) Procédé de criblage et de sélection de molécules utiles dans le traitement de la schizophrénie et des désordres schizoaffectifs à composante anxieuse, paranoïaque ou dépressive, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

10 - la mise en contact *in vitro* d'au moins une substance à cribler avec un échantillon biologique constitué par un extrait de cellules ou des tranches d'organes, de préférence neuronales ou cérébrales, obtenu à partir d'au moins un mammifère non-humain recombinant porteur d'au moins un allèle modifié du gène codant pour une protéine STOP selon l'une quelconque des revendications 1 à 3,

15 - la mesure de l'action de ladite substance à cribler sur lesdites cellules ou tranches d'organes et

- la comparaison des valeurs obtenues avec celles des cellules ou des tranches d'organes d'un échantillon biologique obtenu à partir d'un mammifère non-humain du même type, porteur de deux allèles sauvages du gène codant pour une
20 protéine STOP.

8°) Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que ladite mesure est effectuée à l'aide d'un test de liaison protéine-protéine.

9°) Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que ladite mesure est effectuée par détection de la variation d'intensité d'un signal électrique.

25 10°) Vecteur de recombinaison homologue d'un gène codant pour une protéine STOP, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique d'un gène STOP modifié codant pour une protéine STOP inactivée, de préférence tronquée au niveau d'au moins l'un des exons, notamment l'exon 1.

11°) Utilisation des substances sélectionnées à l'aide du procédé de
30 criblage selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, pour la préparation d'un médicament utile dans le traitement de la schizophrénie et des désordres schizoaffectifs à composante anxieuse, paranoïaque ou dépressive.

12°) Utilisation d'une amorce ou d'une sonde selon la revendication 6, pour le criblage de clones ES recombinants ou d'animaux recombinants.

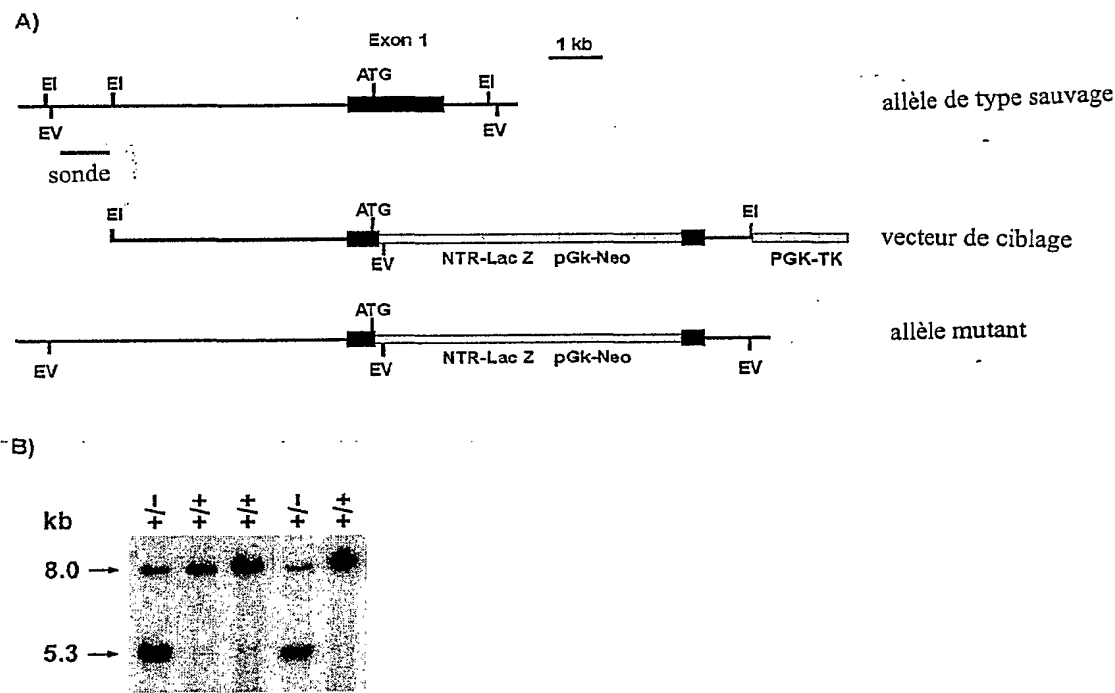


FIGURE 1

2/13

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
1	GAATTCAAAG	ATGCCATTAT	CTTGCTTTCT	TTCGTCCTTA	CTTCTGATCT	CACGGCAGCC	CCAGCAGAGG	TCCTATGAGT	CCTCCAAGGA	CTACGTAGCT	100
101	TCAACACTGA	AGCCTGTAA	TTTGTCCTAT	GGTCCCTTAA	TGCGTAAGGA	AAAAGCCAG	CATTTCACGA	TAAAGCAGGA	AGCAGAGTGA	GTGCTTTTGA	200
201	TATAATAGGA	AAGGTCTAAC	TTTACAGGCTA	TTTAAAGAA	TGATTGGCTAA	GTATCAATAT	GATCACGCTT	TTAAGATGAC	TCATGATCTT	CCACATTAAT	300
301	CTGTTGTGTG	TGGAATTATA	CTGTGTACATT	GCTGGCTATT	AAACCATGGC	TTGCTCTTAA	CATAAACACT	ACTAAATATC	AGATTTTTCT	ATCTATCTAT	400
401	CTATCTATTG	ATCTATCTAT	CTATCTATCT	ATCTATCTAT	ATCTATCTAT	ATCTATCTAT	ATCTATCTAT	ATCTATCTAT	ATCTATCTAT	ATCTATCTAT	500
501	ATATCTATCT	ATCTATCTAT	ATCTATCTAT	ATCTATCTAT	ATCTATCTAT	ATCTATCTAT	ATCTATCTAT	ATCTATCTAT	ATCTATCTAT	ATCTATCTAT	600
601	AGATCCCTCA	TCAACAAGTT	GGATCTGGCC	AAATTTGGCAT	AAGAAAAAAA	AAGCTCAATG	TATTATGTTG	CTAAAGAGCT	GCAAAATTAAC	AACAAATGTA	700
701	ACCCAAACAG	ACACAGCACC	AAACACTGGC	AAGGGGGAGA	GAAACAGGAG	TTCTCATTAG	TTACTACTGA	TCACCTCAAA	CTGGTACAAC	TATGGTGGAA	800
801	GACAGTTTGT	TTTGTTCAC	AACTAACTCA	TCAGTTACTA	CTGAGTACTC	AAAACCTGTA	CAATTATGGT	GGAAGACAGT	TTGCTTTGTT	ACAAAACCTAG	900
901	CTATTCTTTT	GGCCACATA	TCACAATCCT	GCTCCTTGAT	ATTACCCAAA	AAGAGCCCAA	AGCTTATGTC	AGCAGACAAA	CCTGAACACT	GTTTTAGCAG	1000
1001	CTTTGTTTAT	AATTTCCCTC	AATTGAAGCA	ACCAGCATGC	CATTACAGCA	GTGACGGATA	AATAATCTAT	GGGAACACGT	AATATTACAG	AACAAGAGAA	1100
1101	ATGAGATACC	AGCCATGAAA	AGATATGATG	GATCCTTGAG	CTTATTACTA	AGTCAGAGCT	AATCTGAAAC	ACTGCTTACT	ATCTGATGGA	TCAAAAAGGA	1200
1201	GGAACTTACC	TCAGGTGACA	AGATGAACCT	TGTCACCTCC	TAAAGGGTTA	ATCCAGTGAG	ACAGGTGAGG	GGACTGAGAG	GATCCACCCC	AGGAAAGACA	1300
1301	TATTACCTTT	ACAATAACGT	ACTCTTCCCT	TACAGAATTA	TGGCCTCCTA	ATGCACTTCC	CTTGCTATGC	AAGTGTGAGC	ACATGAGTTC	AAGTCTTGCA	1400
1401	CAGTGAAGCA	CAAACTCAGG	TGTGGTCAGG	TGAGCAGCTG	GGACCTCAGC	ACTGTGAGGG	GCAGAGCCAG	GAAGAACTGCA	GGGGCTTGCT	AGCCAGTGGG	1500
1501	CCTAGCTTCA	GATTAAGTCA	GAAACCTTGT	TTCATGGGGA	AAAGAGCCAG	GAATGGTACA	CCGAAATACC	CAGCATCTCT	CCTGATGAGT	ACAGATGTCG	1600
1601	ATATATGCCA	CAATAAATTT	AAATTAAGAG	AAATATTGGG	GACTTTTAAAG	AAATTAAGAG	CTTTCTTTTC	CTTGTAAGT	AGCAGATTTC	CAAGTAGCAG	1700
1701	GCTTCTCAGT	GGCTTATCTG	GGAGGCTCTG	CCTGTGAGAG	TTTTGGATAA	GCTTTTGAAT	ATTAACAGGT	CTGCTGAAG	AGCCATTCTT	TATATGCCAG	1800
1801	GAGCTGCGAG	TAATATTCTT	TGTGAATTGT	GTCACCTCAG	TCTTCAGAAA	AACCTTTGTA	GTTTCAAGAA	GATACCTTTG	CTCAGAGACA	AAGTTAAGGG	1900
1901	TCAGAGGTTG	CCACAATTTG	TCTATGCCCT	AGAGCCAAAA	GTGCGAAGC	CAGGATCCAA	ATCCCTGAGT	ATGGACTCCA	GGCTTCTGCT	CTGGGTGCTT	2000
2001	AACCTTTCTC	ATGAAGCCAC	CCGAGGCGAT	TATTAGCTTC	TACTACCTCT	CCCCCCCCCA	CCCCCCCCCA	CGACCCAGGG	GACTTGCAGC	CACAGACACC	2100
2101	CCAAGTCACA	AAGAGAGTAT	CAGAGCCAAA	GCAGGTCCAT	TAGATTCCAA	AATCTGTTCA	ACCCCAAAGT	AGAAAAGAG	GCAGAAACAC	AACCCGAGAT	2200
2201	CCCCCAAG	AGGTCTCCCT	TTTCTTAGGG	AACCTGCTCT	CATCCAGCCG	CTTACCTCCT	CCCTTGGGTC	TCTTTCCAGA	ATCTTCTTTT	TTCTCCCTTT	2300
2301	CCCCCAGTGC	AGCATCTGGG	CTGGAGAAGA	ACCAATTTTA	TCTGTGGGAA	TAGACTTAC	TGCTTCCCAG	TTGCTTAAAG	AAGGAACAGC	CAGATATTGG	2400
2401	CTAGAGCCGG	TTCCAGGGCC	GGCCTCTCCC	AATCTCATAC	CTTGGGGGAA	GCCTCTGTAG	ACATAGGCTT	AGGTCAAGAA	CCAGCAACAC	GGAGCATATG	2500
2501	TACAGCTTGA	TAGCTGACCA	ATTAAGTGA	GCTCTCCCTT	TAAAGTATC	TATTACGGAG	CTGAGTGGT	AAAAACTTGT	ATTGGTGTTC	CAGAGGACCC	2600
2601	AAGTCCGGGT	CCCAGCATTC	ACATGGGGGT	GGGGTGGGAG	CTCATAGTCG	CCTGCACAGC	ACCAAGGAAA	TCTACTTCTG	ACCTCTTGCC	CTCAGCAGGC	2700
2701	ACCAAGAGCC	ATGTGTCAT	ACCCCAACAC	GACAAAAGCA	CTAATTAATA	GGTGGCGCAA	CCCTTTAATC	CCAGCACTTG	GGAGGCAAG	GCAAGCGGCT	2800
2801	TTTCTGAGTT	CAAGCCGAGC	CTGGTTACAG	ACTGAGTTCC	AGGACAGGCA	AGACTACAC	GAGAAACCTT	GTTCGAAAA	ACAAAAGCCA	AAAAACCAAA	2900
2901	AAAAAAGAAA	GTAAGAAAGA	TTTTTAAAG	AAGCCAAAGC	ATTTAGTCTG	AAACAGACAT	TTTATGGAGG	CGGGGCGGTC	TTACACTTAA	AAAAATAGTA	3000
3001	TCTATTGGTT	GGGCGGATTT	TACGAAAGAG	AGGAGACTCG	TTTATAGGAC	ATGAAGCTGG	CAACTCAAGG	ACAGCAAGTC	CTCAGGAGCT	TGGGACTTGA	3100
3101	ACCTATCAAG	GACCCAGTTC	TGCTGTTGCC	TGGGAACAGA	GAAGGGAGGA	GCTGCCAGAG	AGAAGGGAGG	AGGGGACAGG	GAGAGGGCAA	CCTTTCAGCT	3200
3201	CGCGCCCTGC	ACGACAGCAG	GTGATTTTTT	TTTTTTTTCT	CGAGCGCGCA	TACTCTCAGC	ATCTTTTCTT	GATCACCCCA	CCTTCTTCTG	TGAGCCGCGA	3300
3301	AAAAGGCTGG	GCCGCGCTCT	CTGCAGCAGA	AGACGACAGC	GGCAGCGGCT	GCGGCTACAC	CGGGGGTATA	GATAGAGGCC	TTTGTGCTCT	CTGCTCTGTC	3400
3401	TGGGTTGAG	GTGACCGCTG	CCAAGCCTCG	CTAGGCGGCG	GGCTGAACCA	GACAGAAAGG	AGATAAAAGC	CTGCTTCCGA	TCTTCTCTGC	GCCATGGGCT	3500
3501	AAGCCACAG	CCTCTTTGCC	AAGCATCTCC	TTGCTCTGCC	GGGGTCTGCT	AGACACCCGA	GTGCGAGAGA	GGGCGCGCCC	AGAGCCCTTA	GGCCTGGACT	3600
3601	CTGGGACGCT	AGCCTCTGCT	CTTATCTTTC	ACTGCCCCAC	GCAGCTCTCT	TGCAGCAGGC	GTTTGCAGCC	GGCAATCAGG	GGACTTTACG	GACTTTATCT	3700
3701	CAGCGGTACC	TGTGCTCCCG	GTGCTCTTTG	AGGGTGGAGG	ACGAGGCAAA	GGGCTTCTAA	GGGAAGGAAG	CGGTGGGAAC	CACATTTGGC	GGTCTGGGTT	3800
3801	GGGGTTAAG	GGAGATTGGA	GATTTGATTT	AGGACCAAAA	TTGATGAGAG	TGGTAACTAG	GGGCTGGCCG	TGCATCAAAA	GCGTCCCGCG	CATCCGCCCG	3900
3901	TTCTGGAACC	AGCTGGAACA	GGCGGACATT	CGGCTGCCCG	TGGTTTTCAC	CAAGTACTCG	GAGGCCACCG	AACACCCAGG	CGCCCTCCCG	CAGCCGCCAG	4000
4001	CTCCGCTGCA	CCCGCGGTTA	CGCGCCCTCT	CGCTGCTGCT	CCGACATAGAG	ACCGCAGCCG	CCCAGGGAGA	GTCCGATGCA	GTTCGCGCGG	CAACAGGGCT	4100
4101	TGCGCCCGGG	CCGACGCTCG	AGCCGCGTCC	CCGCGCCGCG	CCCGCCCGGA	GCGGCTTGGG	GTTTGGCGCG	GCCTCAGCCT	CCACTTCCCG	CTCAGGCCCT	4200
4201	CGCGGACTCG	TGATGCGACA	GAGTACCGCG	GCCTGGAAGG	TGCGAGCGCG	CGAGCCCAAG	TGCGCGCGCG	GCAGCGAGTA	CCAGCCGCTC	GACGCGCCCT	4300
4301	TCGAGCGCGA	GACCCGAGCT	TCCGCGCGCT	CCGCGCTGCC	CGCGCGCGCG	CGCGCGCGCG	ACCATCCCTG	GATCCCAAG	CCGCTGCAAA	TCCTCTGCAC	4400
4401	TTGCGAGCCT	TCCCAACCTG	TTCTCGGGGT	GCCCAAGCGT	CGGCCTCAGA	GCCAAAGAGG	CGGGCCCATG	CAACTTTCTG	CTGATGCCCG	GGACCCGAG	4500
4501	GGTGTCTGAG	GAGCCGGGGT	GCTGCGCGCA	GGAAAGGCGT	CCGGTGTAGA	CCAGCGCGAC	ACACGTAGGA	AGGCAAGGCC	AGCATGGATG	GTGACTCGCA	4600
4601	AGCAAGGCGA	CGAAGAGAAC	CCTTGCCCCC	CAGCCCAATC	CACAGCCAGC	GAGGGTGGTC	CTGCACTGCG	AAAGCGCTCC	GGTGAGATC	AGCGTGACAC	4700
4701	ACGCAAGGAG	GCAGGCGCAG	CATGGATGGT	GACTCGCAGC	GAAGGGCAGC	AAGAGAAGCC	TCTGCCCCCA	GCCCAATCCC	AGACCCAGGA	GGGTGGTCTT	4800
4801	GCAGCTGGAA	AGGCGTCCCG	TGCAGATCAG	CGTGACACAC	GCAGGAAGGC	TGAGACCGCG	TGGATGGTGA	CTCGCACGGA	AGGGCACGAG	GAGACCGCGC	4900
4901	TGCCACCCGC	CCAGTCTCAG	ACCCAGGAGG	GCGGCCCGCG	AGCTGGAAAG	GCATCTGGTG	CAGACGAGCG	AGGAAGCGCG	GGCCGCGCTG	GGCCGCGCTG	5000
5001	GATGGTGGCT	CGCTCGGAGG	GGCAGGAACA	GACACCCGCT	GCCCATGGCC	AAGGCACAGG	GCTTGAAGGA	AGCAAGGGCG	GCGCGGTGGC	AGATGCCCTC	5100
5101	AACAGGCAAA	TCCGGGAGGA	GGTGGCGAGT	ACAGTAAGCA	GCTCTTACAG	GTGAGACTGG	GGCAGCAGGT	GATGCTGGTC	ACCTCTGGTC	CCTCGCGAGG	5200
5201	ACCACCCATT	CTACCCCCAC	ACCGAAAGCT	TGCGATTTCAG	CTTCTTCTCC	AGGGCCAGAC	CACACCTCTT	CAGCCACATT	CCAGAACCTT	TTCAACCCAG	5300
5301	ACTTTACTGC	CCACCTCTGT	GGAAAGCCCT	TAACAGTTTC	CACACTGGTT	TTCCGAGCTT	GTTTTCTTGT	CCACCCCTAA	GCCCATTTT	CCTCTTGGCT	5400
5401	GCCTAGCTCA	GTCCCTATC	TGCCCCACAG	AGACCCCTGT	AGTTTCCCCC	TGCTCTATCA	GTTCGCTGCT	TGTCCTCCGT	GGCTTCCCGT	CCCTAGTCTG	5500
5501	CTCCACTCAT	TCATCTCTCA	CTTACTTCCC	CGTGAGACCC	TTTCTCTCTC	CCAGTCTCAC	ATTGCTCTGG	TCTCTTCTTA	TTGATCTCTC	CCCCAGTTCT	5600
5601	GGCCGACACT	CAAGCGCCAC	ACCTTTTTCG	AGATTCTCTT	ACATGCTCTT	TAATACTGG	CTCTAGTACT	TGAAGTCAAT	CCCTCTCTGC	CTCTTCAGTA	5700
5701	GCTTTGACAC	ATTGGGCGAG	CTTTTAAACC	TTCTGGGGCC	TTACATTCTT	TATCTGTAAC	TGGGATCAAT	AATAGTCAAC	TTAGAACTAT	CCACACAGGA	5800
5801	CTGATTTAAG	CTGAGATATT	CTGTACAGTT	TTGAGGATAG	ACTAATATGCC	AAACATGGCT	CTAGCTGATG	GAAAGTGGAA	AGAGATGACT	CGGGATGACT	5900
5901	GGCCATGGCT	GAGATGTACT	GAGAGGTCTT	GTTTCCATTT	ATTAATCTCT	ATGTGATGCC	CCCTTATTCT	TGATTCTGCT	TCTTGGATGT	CCCTAGCCCT	6000
6001	CTTCCCTGTT	GAGGACGCTC	CTTCTTCTCT	TTGTGTTGCA	ATGTTTCTAT	TTTCTTCTTT	AATTAATTAG	TTAATTAATT	AATTTACTTA	TTCCCTTAC	6100
6101	ATCCTGCTCA	GTGCCCTTCA	CAGTCTCTCT	CCCATGCCCC	CACCTTCTCT	CTAAGTGGGT	GGGGTCTCCC	CCTGAGTATC	TCTTACCCTT	GTACATCAAC	6200
6201	GTCTTCTGAG	GGCTGAGCTA	ATCCTCTCCC	ACTCAGGCCA	AACAAGTCAA	CCAGCTAGA	AGAACATATT	CCACGAACAG	CCAACAGCTT	TTTGGGGTAG	6300
6301	CCCCCATTCC	AGTTGTTTGG	GACCCACATG	AAGACCAAGC	TGCACATCTG	CTGTATATGT	GCAGAGAGGT	CTAGGTCCAG	CCCATGTATG	CTCTTTGGTT	6400
6401	TGTGGTTTCA	TCTCTGAGAA	CCCTTAAGGG	TCCAGGTTTA	GTTGACTCTG	TTGATCTTCT	TGTGGAGTTC	CTATCTCCTT	AGGGGCTTAC	AATCTTCTCT	6500
6501	CCTATACTTC	CACAAGACTC	CCCAAGCTCC	ATCCACTGTT	TGGCCATGGG	TGCTGTATC	TGCTGTAGTC	AGCTGCTGGG	TGGAGCTTCT	CAAGGTCAG	6600
6601	ACATTAATGT	GTCCCTTATC	CTCTGGCACA	TTACAGTTCC	TTGAAATGAC	ACGCTTTCAA	ACTTAGAAAC	ATCCCCCTAC	TTCTCCACG	CACACCTGT	6700
6701	TTATACAAAT	CTCCCTGTGC	TCCATGCGAG	CTTGGCTGCG	TTTCTCACCT	CACATCTCAT	CAGTGACAT	CTCTGAATGT	TTAGCTTTTG	GGCTTCTCTT	6800
6801	TATGTTTCTA	CCAACATGAC	CTAGCTGATA	GATCTTAGTT	GACTTGAACA	TGTAGCAGCA	CGGGGCTTGG	GTACTGAGGA	AGCAGATGTT	TGTGATAATG	6900
6901	ATGAGGCTGG	CCTGTGTCAG	CTGTGACTTC	TGAGGCTCTT	ATTACAGCTC	ACAGTCAAGT	GAGTGCCCTT	TTCTTAAGT	TGCAAGGAG	GGTATACAG	7000
7001	TTAGTGTCTT	CTGCTAACCC	TGTGTGTGGG	CGCTTCAGTA	GGCTCTGAG	GCACCTCTCT	CATGACGCA	GAAGACTGGC	ATAAATAGAG	ACTCTATTGT	7100
7101	TAAAGCAAAA	GTACAGGCC	TGCCTCAGAA	TTT							7133

FIGURE 2

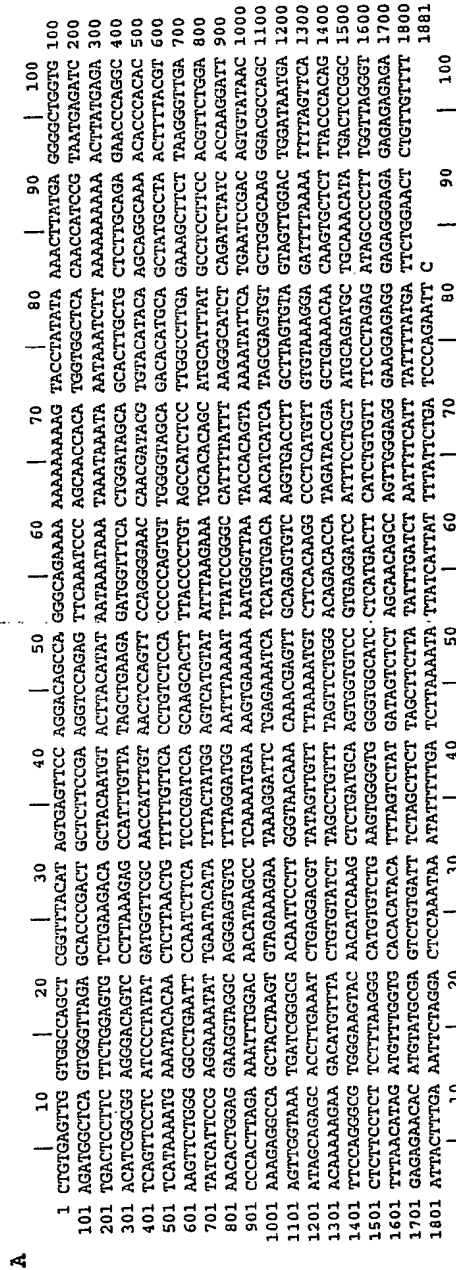


FIGURE 3

4/13

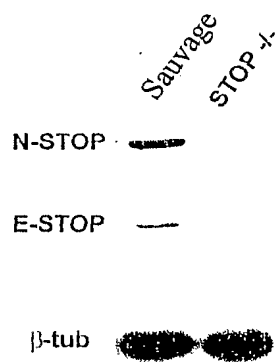


FIGURE 4

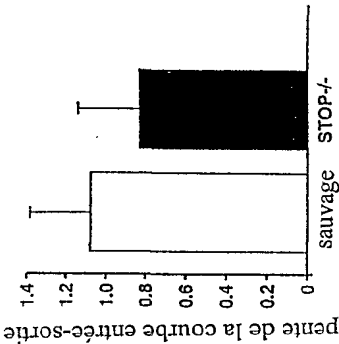


FIGURE 5 (c)

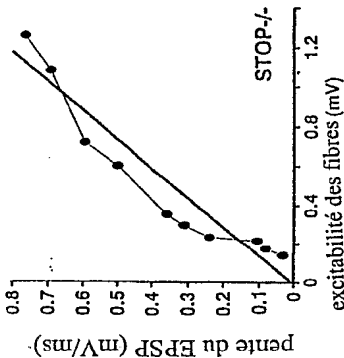


FIGURE 5 (b)

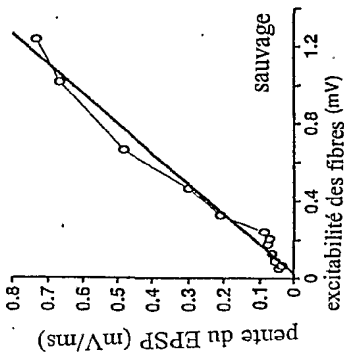


FIGURE 5 (a)

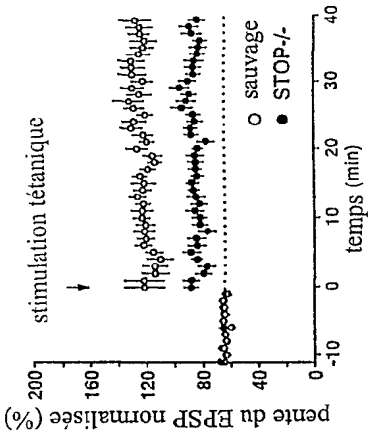


FIGURE 6 (c)

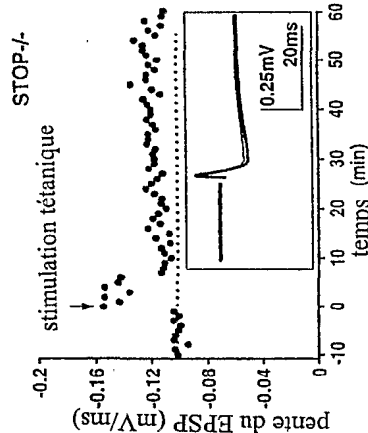


FIGURE 6 (b)

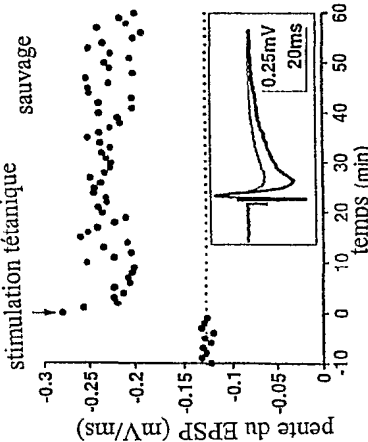


FIGURE 6 (a)

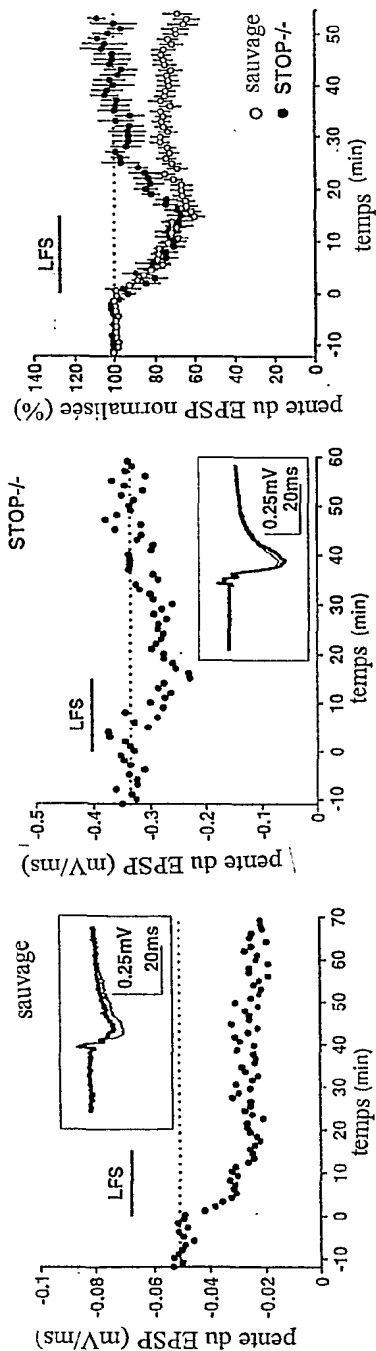


FIGURE 7 (c)

FIGURE 7 (b)

FIGURE 7 (a)

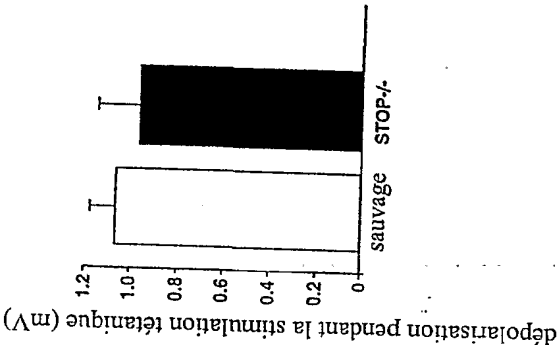


FIGURE 8A

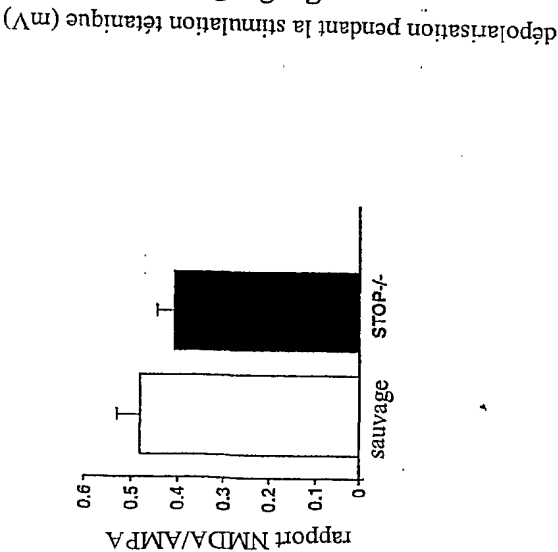


FIGURE 8B

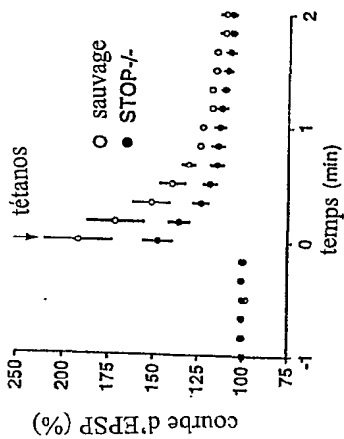


FIGURE 9A

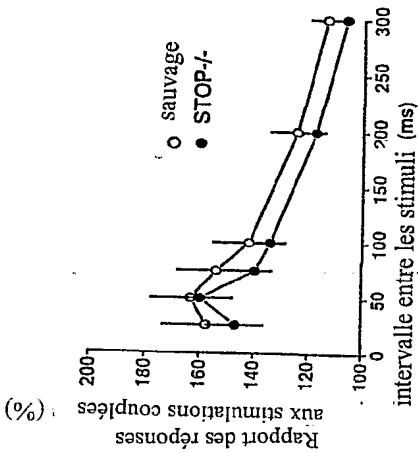


FIGURE 9B

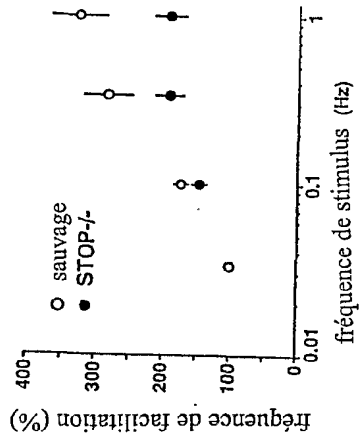


FIGURE 9C

	% de survie des nouveaux-nés
Femelles primipares sauvages (n=6)	93 % (45/48)
Femelles primipares STOP -/- (n=8)	0 % (0/54)

FIGURE 10a

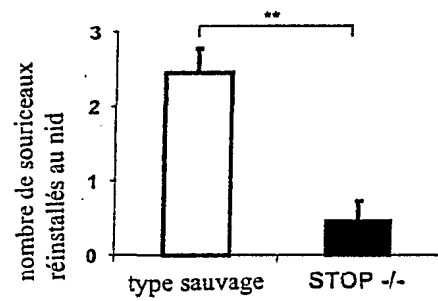


FIGURE 10b

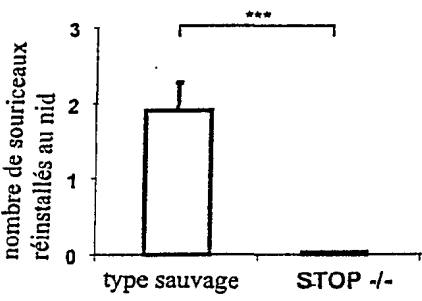


FIGURE 10c

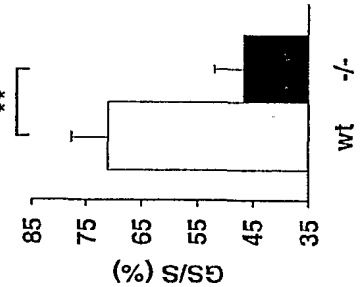


FIGURE 11 (c)

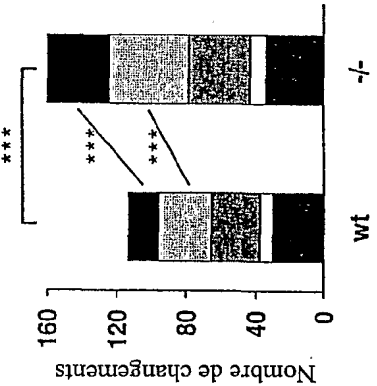


FIGURE 11 (b)

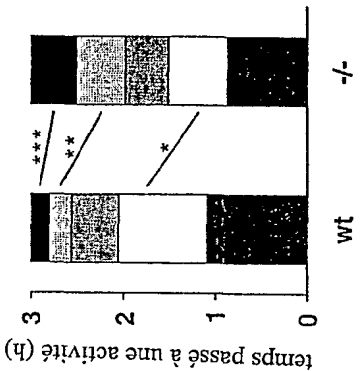


FIGURE 11 (a)

- rester calme
- ▨ marcher
- ▩ faire sa toilette
- dormir
- manger

10/13

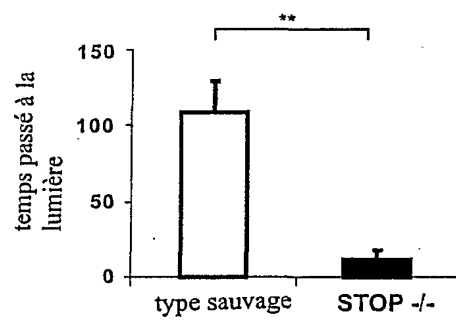


FIGURE 112 (a)

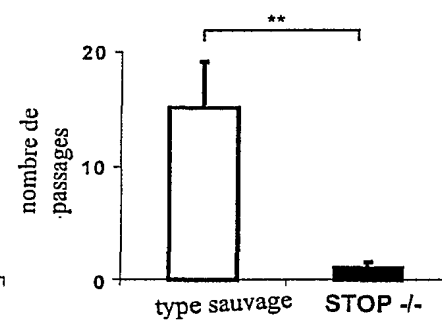


FIGURE 12 (b)

11/13

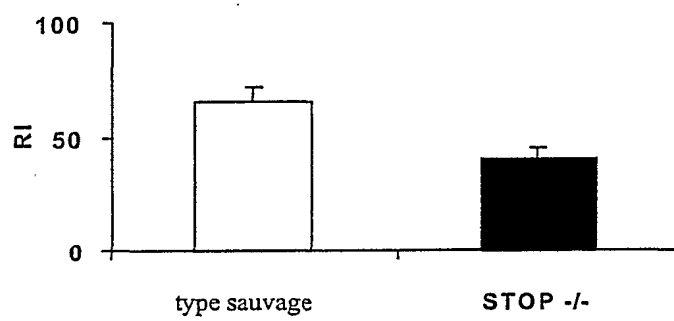


FIGURE 13

12/13

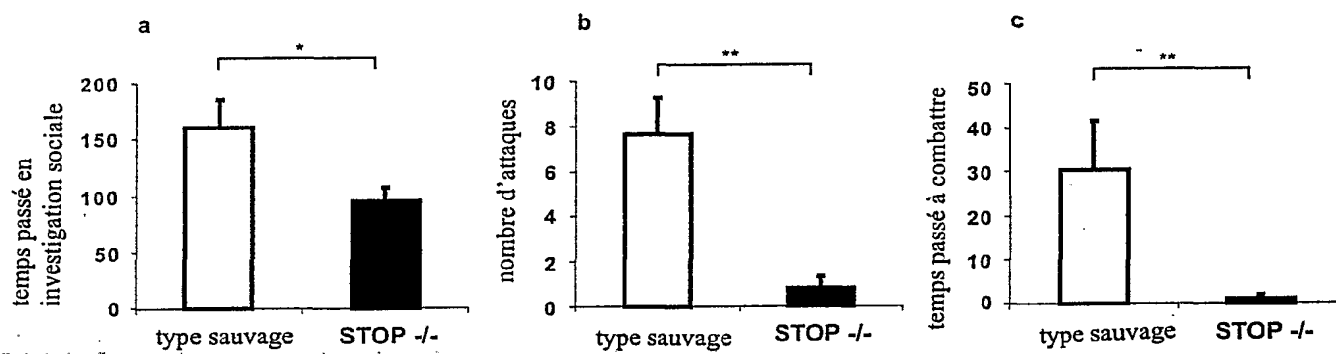


FIGURE 14

13/13

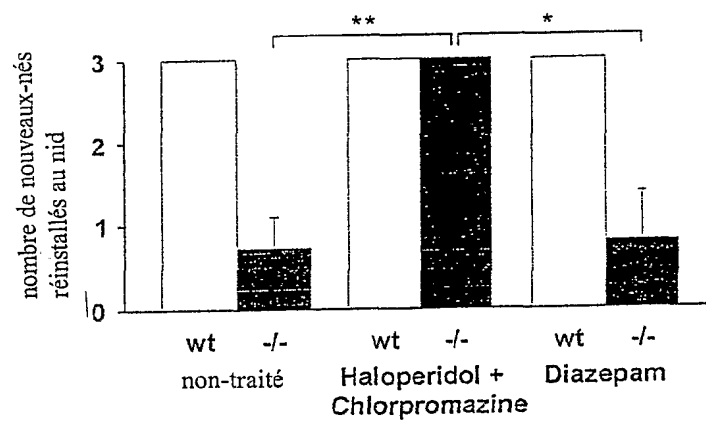


FIGURE 15A

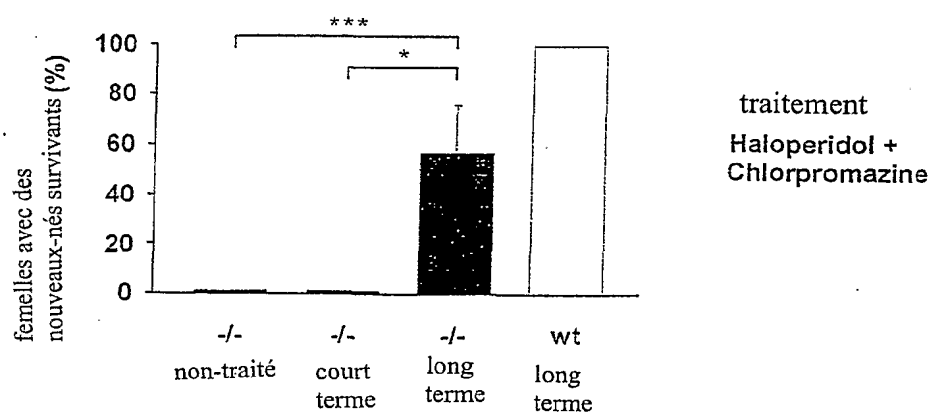


FIGURE 15B

LISTE DE SEQUENCES

<110> COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE
 INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE-INSERM
 ANDRIEUX Annie
 JOB Didier
 DENARIER Eric
 BOSC Christophe
 VERNET Muriel

<120> MAMMIFERES NON-HUMAINS TRANSGENIQUES OU RECOMBINANTS ET LEURS
 APPLICATIONS DANS LE CRIBLAGE DE MEDICAMENTS PSYCHOACTIFS.

<130> SEQ263FR63

<140>

<141>

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 7133

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 1

```

gaattcaaag atgccattat cttgctttct ttcgtcccta cttctgatct cacggcagcc 60
ccagcagagg tcctatgagt cctccaagga ctacgtagct tcaacactga agcctgtaac 120
tttgtcccat ggtcccctaa tgcgtaagga aaaagcccag catttcacga taaagcagga 180
agcagagtga gtgcctttga tataataggg aaggtctaac ttacaggcta ttttaagaat 240
tgattgctaa gtatcaatat gatcagcgtt ttaagatgac tcatgatctt ccacattaat 300
ctgttggtgtg tgggaattata tctgtacatt gctggctatt aaaccatggc ttgctcctaa 360
cataaact actaaatatc agatTTTTCT atctatctat ctatctattg atctatctat 420
ctatctatct atctatctac ctacctacct acctatcatc tatctatcta tcaatcatgt 480
atgtatgtat gtatgtatgt atgtatctat ctatctatct atctatctaa gtgtgtatga 540
gtgtagctgg gcataacatc acatgcttgt atgtagaggt aggaggacaa tcccttgaac 600
agatccctca tcaacaagtt ggatctggcc aaattggcat aagaaaaaaa aagctcaatg 660
tattatgttg ctaaagactt gcaaattaac acaaatgta acccaaacag acacagcacc 720
aaacactggc aagggggaga gaaacaggag ttctcattag ttactactga tcaactcaaaa 780
ctggtacaac tatggtggaa gacagtttgt tttgttacaa aactaactca tcagttacta 840
ctgagtactc aaaactggta caattatggt ggaagacagt ttgctttggt acaaaactag 900
ctattctttt ggccacataa tcacaatcct gctccttgat attaccctaa aagagcccaa 960
agcttatgtc agcacagaaa cctgaacact gttttagcag ctttgtttat aattcccccc 1020
aattgaagca accagcatgc cattcagcag gtgacggata aataatctat gggaacacgt 1080
aatattacag aacaagagaa atgagatacc agccatgaaa agatatgatg gatccttgag 1140
cttattacta agtcagagct aatctgaaac actgcttact atctgatgga tcaaaaagga 1200
ggaatctacc tcaggtgaca agatgaacct tgtcacctcc ttaagggtta atccagttag 1260
acaggtgagg ggactgagag gatccacccc aggaaagaca tattcacctt acaataacgt 1320
actcttccct tacagaatta tggcctccta atgcagttcc cttgctatgc aagtgtgagc 1380
acatgagttc aagtcttgca cagtgaagca caaatcaggg tgtggtcagg tgagcacctg 1440
ggacctcagc actgtgaggg gcagagccag gaaaactgca ggggcttgct agccagttag 1500
cctagcttca gattcagtgaa gaaaccttgt ttcatgggga aaaaggcaga gaatggtaga 1560
gcagaatacc cagcatcctc ccttagacgt acacatgtgc atatatgcca caaataaatt 1620
aattaagagt aaatatTTTg gacttttaag aaaatgaact ctttcttttc cttgtgaagt 1680
agcagatttc caagtagcag gcttctcagt ggcttatctg ggaggctctg cctgtgagac 1740
ttttggataa gcttttgaat attaacaggt tctgctgaag aagccatttc tatatgccag 1800

```

gagctgcagc	taatatattct	tgtgaattgt	gtcacttcag	tcttcagaaa	aactttgtaa	1860
gttcagaata	gatacccttg	ctcagagaca	aagttaaggg	tcagaggttg	ccacaatttg	1920
tctatgcctt	agagccaaaa	gtgcagaagc	caggatccaa	atccctgagt	atggactcca	1980
ggcttctgct	ctgggtgctt	aactttcctc	atgaaaccac	cccagggcat	ttattagctc	2040
tactaccctc	cccccccca	ccccccgccc	cgacccaggg	gactgcagcc	cagagacaac	2100
ccaagtcaca	aagagagtat	cagagccaaa	gcagggtccat	tagattccaa	aatctgttca	2160
accccaaaagt	agaaaagaag	gcagaaaacac	aaccgagaat	cccctcaaag	aggtctccct	2220
tttcctaggg	aactgtctct	catccagccg	cttacctcct	cccttgggtc	tctttccaga	2280
atcttccctt	ttctcccttt	cccccagtg	agcatctggg	ctggagaaga	accaatttta	2340
tctgtggaga	gtagactcac	tgcttcccag	ttgcttaaag	aaggaacagc	cagagtattg	2400
ctaggccggc	ttcccaggcc	ggcctctccc	aatctcatac	aactggggaa	gcccctgtac	2460
acataggctt	aggtcaagaa	ccagcaacac	ggagcataag	tacagcctga	tagctgacca	2520
attaactgca	gctctccctt	ttaaagtatc	tattcagggg	ctgagtgggt	aaaaacttgt	2580
attggtgttc	cagaggaccc	aagtccgggt	cccagcattc	acatgggggt	ggggtgggag	2640
ctcatagtcg	cctgcacagc	accaggga	tctactctg	accctctggc	ctcagcaggc	2700
accagagccc	atgtgcatat	acccaacaca	gacaaaagca	ctaattaaaa	ggtggcgcaa	2760
ccctttaatc	ccagcacttg	ggaggcaaag	gcaagcggt	tttctgagtt	caaggccagc	2820
ctgggttacg	actgagttcc	aggacagcca	agactacaga	gagaaacct	gttcgaaaaa	2880
acaaaagcca	aaaacaaaaa	aaaaaaaaaa	gtaaaaaaga	tttttaaaag	aagccaaagc	2940
atttagtctg	aaacagacat	ttcatggagg	cggggcggtc	ttacacttaa	aaaattagta	3000
ttcattgggt	ggggcgatgt	tacgaaagag	aggagactcg	gttttaggac	atgaagctgg	3060
caactcaagg	acagcaagtc	ctcaggagct	tgggacttga	acctatcaag	gaccagttc	3120
tgctgttgcc	tggaacaga	gaaggagga	gctgccagag	agaaggagag	aggggacagg	3180
gagagggcaa	cctttcagct	gcgcgcctcg	acgacagcag	gtgatttttt	tttttttct	3240
gcagcgcgca	tactctcagc	atcttttctt	gatcacccca	cctcccttgc	tgagccgcaa	3300
aaaaggggtg	ggccgcctct	ctgcagcaga	agacgacagc	ggcagcggt	gcggcatcac	3360
cgggggtata	gatagaggcc	gttttgctct	ctgctctgtc	tggttgtag	gtgaccgctg	3420
ccaagcctcg	ctaggcgcc	ggctgaacca	gacagaaagg	agataaaagc	ctgcttgcca	3480
tccttcctgc	gccatggctt	aagcccacag	cctctttgcc	aagcatctcc	ttgctctgcc	3540
gggggtctgct	agacaccgca	gtcgcagaga	gggcgcgccc	agacgcccta	ggcctggact	3600
ctgggacgct	gagcctcgct	cctattcttc	actgccaca	gcagctcctc	tgacgaggc	3660
gtttgcagcc	ggcaatcgag	ggactttacg	gactttatct	cagcggtagc	ttgtccccgg	3720
gtgctctttg	aggggtggag	acgaggcaaa	gggcttctaa	gggaaggag	cgggtgggaa	3780
cacattggcg	ggtctgggtt	gggggttaa	ggagattgga	gatttgattt	aggaccaca	3840
aaaggctttg	tggttaacat	ggcgtggcgg	tgcatcaca	ggcctgctg	catcgcccg	3900
ttctggaaac	agctggacaa	gcgggacatt	gcgggtgccg	tggttttcac	caagtactcg	3960
gaggccaccg	aacaccacag	cgccctccg	cagccgccag	ctccgctgca	gcccgcgtta	4020
gcgccccctt	cgctgtctgt	cgccatagag	acgcagccag	cccagggaga	gtcggatgca	4080
gttgcccggg	caacagggct	tgcccccggg	cccagcgtcg	accgcgagac	tgtagccgcc	4140
cccggccgga	gcgggctggg	cttgggcgcg	gcctcagcct	ccacttcogg	ctcaggcccc	4200
gcggactcgg	tgatgcgaca	ggactaccgc	gcctggaaag	tgacgcggcc	cgagccaagc	4260
tgccggccgc	gcagcgagta	ccagccgtcc	gacgcgccct	tcgagcgca	gaccagtagc	4320
cagaaggact	tccgcgcctg	gccgtgcctc	cggcgccggg	accatccctg	gatccccaag	4380
ccggtgcaaa	tccctgcgac	ttcgcagcct	tcccaacctg	ttctcggggg	gccaagcgt	4440
cggcctcaga	gccaagagcg	cgggcccattg	caactttctg	ctgatgccc	ggacccggag	4500
ggtgctggag	gagccggggg	gctggcggca	ggaaaggcgt	ccggtgtaga	ccagcgcgac	4560
acacgtagga	aggcagggcc	agcatggatg	gtgactcgca	acgaagggca	cgaagagaag	4620
cctctgcccc	cagcccaatc	ccagaccacg	gagggtgggt	ctgcagctgg	aaaggcgtcc	4680
ggtgcagatc	agcgtgacac	acgcaggaag	gcagggccag	catggatggg	gactcgcagc	4740
gaagggcacg	aagagaagcc	tctgccccca	gcccattccc	agaccagga	gggtggtctc	4800
gcagctggaa	aggcgtccgg	tgcatatcag	cgtgacacac	gcaggaaggc	tgaccccgcg	4860
tggatggtga	ctgcacgga	agggcacag	gagacgcgcg	tgccaccgcg	ccagtctcag	4920
accaggagg	gcggccccgc	agctggaaag	gcactctggt	cagacgagcg	cgacacgagg	4980
aggaaggcgg	ggccggcctg	gatggtgcgt	cgctcggagg	ggcacgaaca	gacaccgcct	5040
gcccattgcc	aaggcacagg	gcctgaagga	agcaaggggc	gcgcggtggc	agatgccctc	5100
aacaggcaaa	tccgggagga	ggtggcgagt	acagtaagca	gctcttacag	gtgagactgg	5160
ggcagcaggt	gatgctgggt	accctcatcc	cctcgcgagg	accacccatt	ctacccccac	5220
accgaaagct	tcgcattcag	cttctttctc	agggccagac	cacacctctt	cagccacatt	5280

```

ccagaaccct ttcaaccag actttactgc ccaccctgtc ggaaagccct taacagtttc 5340
cacactgggt ttcccagctt gttttttgtg ccacccttaa gccacatttt cctcttggct 5400
gcctagctca gctccctatc tgccccacag agaccctgtc agttttcccc tgtctcatca 5460
gttcgcctgc tgtcccagcc tggtcccggt cctagtgoc ctocactcat tcaattctca 5520
cttacttccc cgtgagaccc tttctcctcc ccagtctcac attgtcctgg tctcttccca 5580
ttgattcctc ccccagttct ggccgacact caagcgccac acccttttcc agatttctct 5640
acatgctcct taataactgg ctctagtact tgaagtcatt cccctcctgc ctcttcagta 5700
gctttgacac attggcgag ctttttaacc ttctggggcc ttcacattct tatctgtaac 5760
tgggatcaat aatagtcac ttagaactat ccacacagga ctgatttaag ctgagatatt 5820
ctgtacagtt ttgaggatag actaaatgcc aaacatgggt ctagctgatg gaaagtggaa 5880
agagatgact cgggatgact ggccatgcct gagatgtagt gagaggctct gtttccattt 5940
atactctcct atgtgatgcc ccttattct tgaattctgc tccctggatgt cctagccct 6000
cttccctgtt gaggcagctc tttcttctcc ttgtgttcag atgtttctat ttttctttt 6060
aattaattag ttaattaatt aatttactta ttccctttac atcctgtcca ctgccccca 6120
cagtccttct ccccatgccc cacttcttct ctaagtgggt ggggtctccc cctgagtatc 6180
tccctaccct ggtacatcaa gttctgag ggctagtcta atcctctccc actcaggcca 6240
aacaagtcaa ccagctaga agaacatatt ccacgaacag ccaacagctt tttggggtag 6300
ccccattcc agttgtttgg gacccacatg aagaccaagc tgacatctg ctgtatatgt 6360
gcagagaggt ctaggtccag cccatgtatg ctctttgggt tgtgggttcag tctctgagaa 6420
cccctaaggg ttccagggtta gttgactctg ttgatcttcc tgtggagtto ctatctcctt 6480
aggggcctac aatccttctc cctatacttc cacaagactc cccaagctcc atccactgtt 6540
tgcccatggg tgtctgtatc tgtctgagtc agctgctggg tggagcttct caaaggctcag 6600
acattaatgt gtcccttctc ctctggcaca ttacgttcc ttgaaaatga acgctttcaa 6660
acttagaaac atccccatc ttctccacg cacaccctgt ttatacaatt ctccctgtgc 6720
tgcattgcagc cttggcctgc tttctcaact cacatccatc cagtgcacat ctctgaatgt 6780
ttagcttttg ggcttctctt tatgtttcta ccaacatcag ctagctgata gatcctagtt 6840
gacttgaaca tgtagcagca ccgggcttgg gtactgagga agcagatgtg tgtgataatg 6900
atggagctgg ccttgtgcag ctgtgacttc tgaggtcttc attcagctcc acagtcagtt 6960
aggtgccctt ttctaagtg tggaaaggaag ggctacagag ttagtgtctt ctgctaacc 7020
tgtgtgtggg cgcttcagta ggctctgcag gcaactcctc catgcagcca gaagactggc 7080
ataaatagag actctattgt taaggcaaaa gtcagagccc tgcctcagaa ttc 7133

```

<210> 2

<211> 1881

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 2

```

ctgtgagttg gtggccagct cggtttacat agtgagttcc aggacagcca gggcagaaaa 60
aaaaaaaaag tacctatata aaacttatga ggggctgggt agatggctca gtgggttaga 120
gcacccgact gctcttccga aggtccagag ttcaaatccc agcaaccaca tgggtggctca 180
caaccatccg taatgagatc tgactccttc ttctggagtg tctgaagaca gctacaatgt 240
acttacatat aataaataaa taaataaata aataaatctt aaaaaaaaaa acttatgaga 300
acatcgggcg agggacagtc ccttaaagag ccatttgtta tagctgaaga gatggtttca 360
ctggatagca gcacttgctg ctcttgacga gaaccaggc tcagttcctc atccctatat 420
gatggttcgc aaccatttgt aactccagtt ccagggggaa caacgatacg tgtacatata 480
agcaggcaaa acacccacac tcataaaatg aaatacacaa ctcttaactg tttttgttca 540
cctgtctcca cccccagtggt tggggtagca gacacatgca gctatgccta acttttacgt 600
aagttctggg ggctgaatt ccaatottca tcccgatcca gcaagcactt ttaccctgt 660
agccatctcc ttggccttga gaaagcttct taagggttga tatcattccg aggaaaatat 720
tgaatcataa ttactatgg agtcatgtat atttaagaaa tgacacagc atgcatttat 780
gcctccttcc acgttctgga aacactggag gaaggtaggc agggagtgtg tttaggatgg 840
aatttaaaat ttatccgggc cattttatct aagggtatct cagatctatc accaaggatt 900
ccacttaga aaatttgac aacataagcc tcaaaatgaa aagtgaaaaa aatgggttaa 960
taccacagta aaaatattca tgaatccgac agtgtataac aaagaggcca gctactaagt 1020
gtagaaagaa taaaggattc tgagaaatca tcatgtgaca aacatcatca tagcgagtgt 1080
gctgggcaag ggacgccagc agttggtaaa tgatcgggcg acaattcctt gggtaacaaa 1140

```

```

caaacgagtt gcagagtgtc aggtgacctt gcttagtgta gtagttggac tggataatga 1200
atagcagagc accttgaaat ctgaggacgt tatagttggt ttaaaaatgt cttcacaagg 1260
ccctcatggt gtgtaaagga gatTTTaaa ttttagttca acaaaaagaa gacatgttta 1320
ctgtgtatct tagcctgttt tagttctggg acagacacca tagataccga gctgaaacaa 1380
caagtgtctt ttaccacacag ttccaggcg tggaagtac aacatcaaag ctctgatgca 1440
agtgggtgcc gtgaggatcc atttctgtct atgcagatgc tgcaaacata tgactccggc 1500
ctcttctctt tctttaaggg catgtgtctg aagtgggggtg ggggtggcatc ctcagtactt 1560
catctgtgtt ttccctagag atagcccctt tggttagggt ttaacatag atgtttggtg 1620
cacacataca tttagtctat gatagtctct agcaacagcc agttgggagg gaaggagagg 1680
gagagggaga gagagagaga gagagaacac atgtatgcga gtctgtgatt tctagcttct 1740
tagcttctta tatttgatct aattttcatt tattttatga ttctggaact ctgttggttt 1800
attactttga aattctagga ctccaaataa atatttttga tcttaaaata ttatcattat 1860
tttattctga tcccagaatt c                                     1881

```

<210> 3
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:amorce
 oligonucléotidique

<400> 3
 agagtcggat gcagttgccc ggcaaca 27

<210> 4
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:amorce
 oligonucléotidique

<400> 4
 ggctcctcca gcaccctccg ggtcccg 27

<210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:amorce
 oligonucléotidique

<400> 5
 aacaggtgt gcgaggagga a 21

<210> 6
 <211> 1183
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 6

```

gatatcattc cgaggaaaat attgaataca tatttactat ggagtcattg atattttaaga 60
aatgcacaca gcatgcattt atgcctcctt ccacgttctg gaaacactgg aggaaggtag 120
gcagggagtg tgtttaggat ggaattttaa atttatccgg gccattttat ttaagggcat 180
ctcagatcta tcaccaagga ttcccactta gaaaatttgg acaacataag cctcaaaatg 240
aaaagtgaia aaaatgggtt aataccacag taaaaatatt catgaatccg acagtgtata 300
acaaagaggc cagctactaa gtgtagaaa gataaaggat tctgagaaat catcatgtga 360
caaacatcat catagcgagt gtgctgggca agggacgcca gcagttggta aatgatcggg 420
cgacaattcc ttgggtaaca aacaaacgag ttgcagagtg tcaggtgacc ttgcttagtg 480
tagtagttgg actggataat gaatagcaga gcacctgaa atctgaggac gttatagttg 540
ttttaaaaat gtcttcacaa ggccctcatg ttgtgtaaag gagattttaa aatttttagtt 600
caacaaaaag aagacatgtt tactgtgtat cttagcctgt tttagttctg ggacagacac 660
catagatacc gagctgaaac aacaagtgtc ctttaccac agttccaggg cgtgggaagt 720
acaacatcaa agctctgatg caagtgggtg ccgtgaggat ccatttcctg ctatgcagat 780
gctgcaaaac tatgactccg gcctcttcct cttctttaag ggcattgtgtc tgaagtgggg 840
tggggtggca tcctcatgac ttcatctgtg ttttccctag agatagcccc tttggttagg 900
gttttaacat agatgttttg tgcacacata catttagtct atgatagtct ctagcaacag 960
ccagttggga ggaaggaga gggagaggga gagagagaga gagagagaac acatgtatgc 1020
gagctctgtg tttctagctt cttagcttct tatatttgat ctaattttca tttattttat 1080
gattctggaa ctctgttgtt ttattacttt gaaattctag gactccaaat aaatattttt 1140
gatcttaaaa tattatcatt attttattct gatcccgaa ttc 1183

```